

Studien zu den chemischen Modifizierungen von Pektin und Polygalacturonsäure



**FRIEDRICH-SCHILLER-
UNIVERSITÄT
JENA**

Dissertation

zur Erlangung des wissenschaftlichen Grades „doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-
Universität Jena

von Master of Science Marvin Kayser
geboren am 21.10.1990 in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Heinze

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Michael Gottschaldt

Tag der öffentlichen Verteidigung:

11.06.2020

„Wissenschaft wird von Menschen gemacht“

(Werner Heisenberg, Autobiografie „Der Teil und das Ganze“,

Piper & Co. Verlag München 1969)

Inhalt

Inhalt.....	6
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung.....	12
2 Allgemeiner Teil.....	15
2.1 Pektin und seine Strukturmerkmale.....	15
2.1.1 Homogalacturonan	16
2.1.2 Rhamnogalacturonan I.....	18
2.1.3 Rhamnogalacturonan II.....	20
2.1.4 Weitere Strukturelemente.....	22
2.1.5 Die makromolekulare Struktur von Pektin	23
2.2 Interaktionen und elektrostatische Wechselwirkungen von Pektin	27
2.2.1 Eigenschaften von Pektingelen	29
2.3 Chemische Modifizierungen von Pektin	33
2.4 Analytische Methoden zur Charakterisierung von Pektin.....	50
3 Spezieller Teil.....	53
3.1 Acetylierung von Pektin und Polygalacturonsäure	53
3.2 Untersuchung zur ionischen Gelbildung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ..	66
3.3 Silylierung von Polygalacturonsäure	74
3.4 Ionische Flüssigkeiten	98
3.5 Zusammenfassung	108
4 Experimenteller Teil	111
4.1 Materialien	111
4.2 Methoden	111

4.2.1 Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR) -Spektroskopie	111
4.2.2 Kernspinresonanz (NMR) -Spektroskopie.....	111
4.2.3 Größenausschlusschromatographie (GPC)	112
4.2.4 Rheologie	112
4.2.5 Röntgenbeugung (XRD).....	112
4.2.6 Elementaranalyse	113
4.2.7 Fluoreszenzmikroskopie	113
4.2.8 Siliziumbestimmung (gravimetrisch)	113
4.3 Allgemeine Synthesevorschriften.....	113
4.3.1 Vorbehandlung der Pektine – Entaschen & Umsalzung.....	113
4.3.2 Acetylierung von Pektin mit Essigsäureanhydrid	114
4.3.3 Acetylierung von Polygalacturonsäure mit Essigsäureanhydrid	115
4.3.4 Acetylierung von Polygalacturonsäure mit Acetylchlorid	115
4.3.5 Acetylierung von Polygalacturonsäure mit Essigsäurevinylester	116
4.3.6 Thiocarbamidierung von Polygalacturonsäure in Formamid	116
4.3.7 Thiocarbamidierung von Polygalacturonsäure in 1-Butyl-3- methylimidazoliumchlorid (BMIMCl).....	117
4.3.8 Umsetzung von Polygalacturonsäure mit Berberinchlorid.....	117
4.3.9 Silylierung von Polygalacturonsäure mit Trimethylsilylchlorid (TMSCl).....	119
4.3.10 Silylierung von Polygalacturonsäure mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS)	119
4.3.11 Silylierung von Polygalacturonsäure mit <i>tert.</i> -Hexyldimethylchlorsilan (TDSCI). 120	
4.3.12 Silylierung von Polygalacturonsäure mit <i>tert.</i> -Butyldimethylchlorsilan (tBDMCl)	121
4.3.13 Silylierung von Polygalacturonsäure mit Dimethylphenylchlorsilan (DMPSCI)... 121	
4.3.14 Silylierung von Polygalacturonsäure mit Dimethylvinylchlorsilan (DMVinCl)..... 122	

4.3.15 Lösen von Polygalacturonsäure in 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (BMIMCl)	123
5 Anhang.....	125
Literaturverzeichnis	125
Abbildungsverzeichnis	139
Tabellenverzeichnis	147
Publikationsliste.....	148
Danksagung	149

Abkürzungsverzeichnis

[η]	Grenzviskosität
^{13}C -NMR	Kernspinresonanz des ^{13}C -Isotops
^1H -NMR	Kernspinresonanz des ^1H -Isotops
Ac_2O	Essigsäureanhydrid
AFM	Atomic Force Microscopy
AGE	Anhydrogalacturonsäureeinheit
BMIMCl	1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid
CDCl_3	deutერიertes Chloroform
CDI	N,N' -Carbonyldiimidazol
d.h.	das heißt
DE	durchschnittlicher Veresterungsgrad an der Carboxygruppe
DM	Substitutionsgrad an Methylgruppen
DMAC	N,N' -Dimethylacetamid
DMF	N,N -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
$\text{DMSO-}d_6$	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DP	durchschnittlicher Polymerisationsgrad
DS	durchschnittlicher Substitutionsgrad
DS_{Ac}	durchschnittlicher Substitutionsgrad an Acetatgruppen
EA	Elementaranalyse
EtOH	Ethanol
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GPC	Größenausschluss-Chromatographie

HM	hochmethyliert (Substitutionsgrad der Methylgruppen am Pektin > 0,5)
HMBC	zweidimensionaler Kernspinresonanzspektroskopie (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IL	ionische Flüssigkeit(en)
IR	Infrarotspektroskopie
KE	Kapillarelektrophorese
L	Liter
LM	geringmethyliert (Substitutionsgrad der Methyl-Gruppen < 0,5)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
M _w	gewichtsmittlere Molmasse
NMR	Kernmagnetresonanzspektroskopie
PME	Pektinmethylesterasen
PS	Polysaccharid
RT	Raumtemperatur
T	Temperatur
t	Zeit
TBA	Tetrabutylammonium
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid Trihydrat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
TosCl	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid

XRD	Röntgenbeugung / Röntgendiffraktion
δ	chemische Verschiebung in ppm (NMR-Spektroskopie), Deformationsschwingung (IR-Spektroskopie)
ν	Valenzschwingung in cm^{-1}

1 Einleitung

Pektin, jeder kennt es. Der Verzicht dieses Rohstoffes ist in der Lebensmittelindustrie, wo es bereits seit Jahrzehnten für die Stabilisierung von Fruchtzubereitungen, als Emulgator oder auch als Gelierkomponente verwendet wird, nicht vorstellbar. Für die kommerzielle Herstellung stellen sowohl Apfeltrester als auch Zitruschale die primäre Rohstoffquelle dar. In geringerem Umfang finden aber auch Zuckerrübenmasse Anwendung, da diese als Nebenprodukt bei der Zuckerraffination anfällt.^[1,2] Die strukturellen Eigenschaften von Pektin machen dieses Biopolymer besonders interessant für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie (Abbildung 1). Als Polyelektrolyt ist es in einem weiten pH-Bereich wasserlöslich und hat zudem die Eigenschaft, stabile Gele zu bilden.

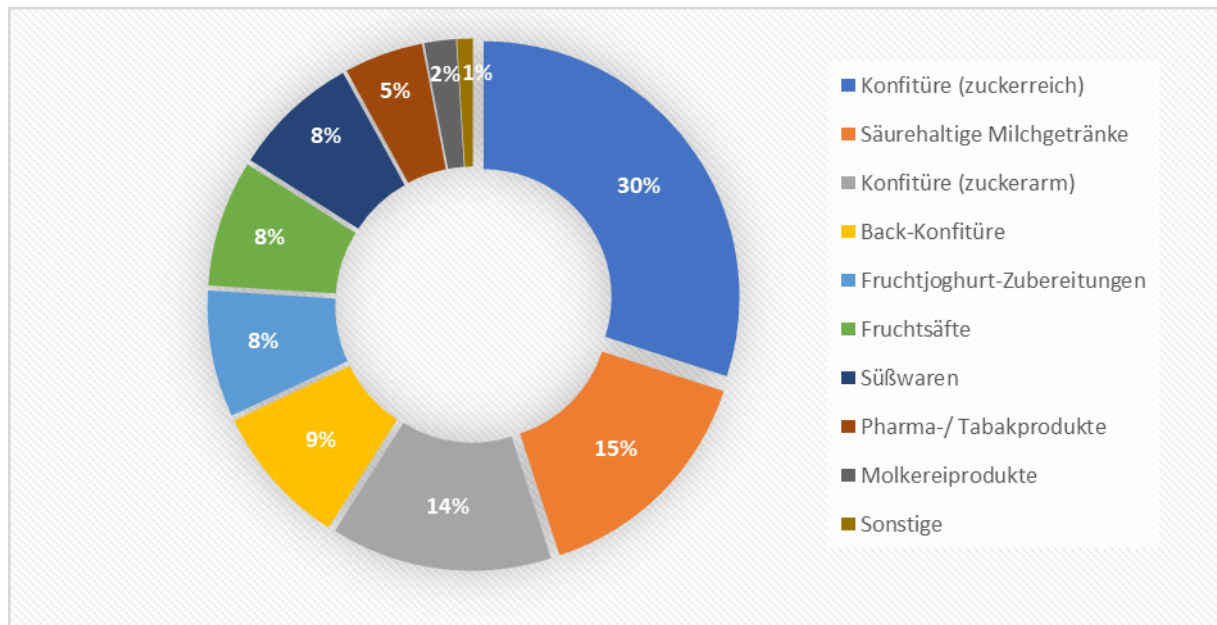


Abbildung 1: Marktschätzung von Pektinanwendungen nach IMC International Hydrocolloids Review.

Das Biopolymer besitzt interessante Struktureigenschaftsbeziehungen, wobei das Molekulargewicht, der Veresterungs- und der Acetylierungsgrad sowohl die Viskosität der Lösung als auch das Wasserrückhaltevermögen des Polymers in Gelen stark beeinflussen kann. Neben der Lebensmittelindustrie findet Pektin als Nischenprodukt Anwendung in nicht nahrungsmittelbasierten, industriellen Prozessen, die mit einem Anteil von weniger als einem Prozent auftreten. Die chemische Modifizierung von Pektin für die metallioneninduzierte Gelbildung auf Metalloberflächen steht in dieser Arbeit im Fokus. Ein besonderes Augenmerk soll dabei auf eine weiterführende Anwendung in industriellen

1 Einleitung

Prozessdimensionen gelegt werden. Durch Einführung von Substituenten am Polysaccharid sollen die Struktureigenschaftsbeziehungen verändert und aufgeklärt werden. Im Vordergrund steht hierbei besonders die Hydrophobierung des Pektinrückgrats, welche Rückschlüsse über die ionisch induzierte Gelbildung erlaubt. Dabei soll das Pektin jedoch als Hydrokolloid seine Wasserlöslichkeit nicht verlieren (Abbildung 2). Ziel ist es, am Prozessende ein hydrophoberes Gel zu erhalten, um Wasser aus dem sich bildenden Gelfilm schneller auszuschleusen und die Stabilität des Gelfilms zu erhöhen. In Bezug auf Synthesen am Pektin und seinen Derivaten gab es in den letzten Jahren nahezu keine neuen Erkenntnisse. Die dennoch veröffentlichten Artikel verzichteten meist auf eine umfangreiche Charakterisierung der erhaltenen Derivate. Ein Kernproblem der Pektinanalytik ist die Löslichkeit des Biopolymers. Die Löslichkeit der Verbindung ist auf Wasser und Formamid beschränkt, was die Optionen zur Derivatisierung des Polysaccharids stark beeinflussten.

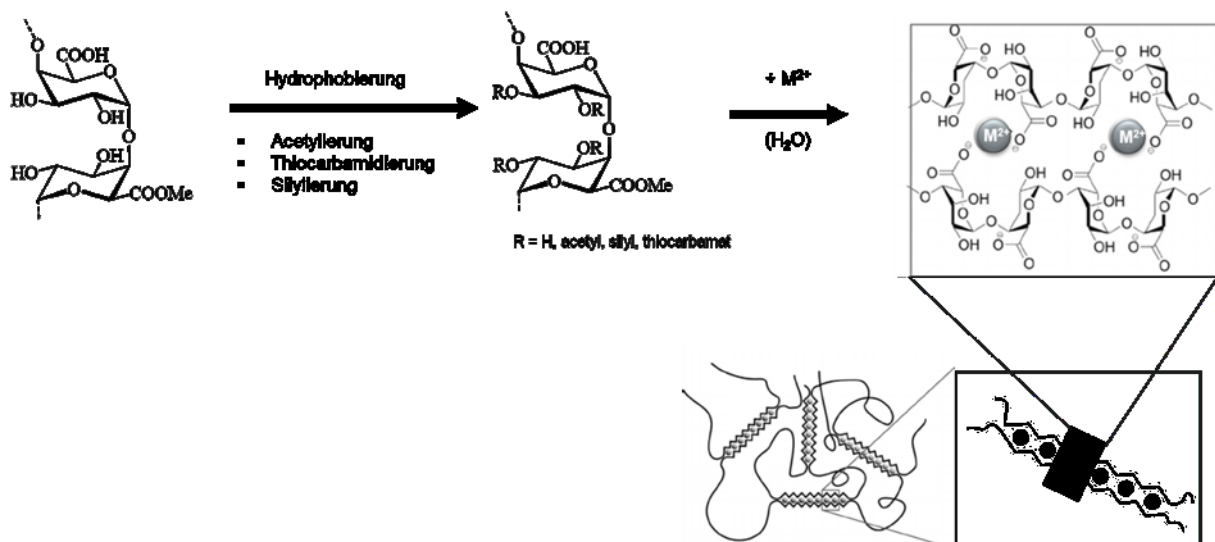


Abbildung 2: Schematische Darstellung der zielorientierten Hydrophobierung von Polygalacturonsäure unter Erhaltung der Wasserlöslichkeit und der metallioneninduzierten Gelbildungseigenschaft.

Natives Pektin besitzt bereits hydrophobe Bereiche, welche für die hier betrachtete Applikation durchaus relevant sind, gleichermaßen ist es aber aufgrund seiner Polyelektrolyteigenschaften enorm hydrophil, was die Ausbildung einer starken Hydrathülle begünstigt. Diese Hydrathülle soll durch Hydrophobierungen am Polysaccharidrückgrat verringert werden, um somit die Gelfilmbildung prozessfreundlicher zu gestalten. Basierend auf dieser Tatsache wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um Pektin chemisch zu modifizieren.

Bei einer Vielzahl von Polysacchariden sind Synthesen zur Erhöhung der Hydrophobie bereits etabliert. Cellulose lässt sich beispielsweise durch die Einführung von Trimethylsilyl-Gruppen

1 Einleitung

in Abhängigkeit vom durchschnittlichen Substitutionsgrad (DS) organolöslich machen. Funktionalisierungen, wie Silylierung oder Acylierung, sind gut untersuchte Methoden, um hydrophobe Derivate der Cellulose zu generieren. Die Herausforderungen bei Pektin sind allerdings der polyelektrolytische Charakter und die strukturelle Komplexität, welche eine homogene Reaktionsführung in aprotischen Lösungsmitteln, mit Ausnahme von Formamid, bisher nicht erlauben. Diese Tatsache brachte *D. Mohnem* auf der *American Chemical Society* Konferenz 2017 in Ihrem Vortrag zu dem Ausdruck *“Pectin is structurally and functionally the most complex polysaccharide in plant cell walls.”*

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der homogenen Derivatisierung von Pektin. Hierzu werden zum einen Untersuchungen in Formamid durchgeführt. Zum anderen werden ionische Flüssigkeiten als vielversprechende Pektinlösungsmittel für homogene Derivatisierungen in die Betrachtungen einbezogen und Unterschiede zum Formamid studiert. Um die Komplexität und Vielzahl von Faktoren zu den Funktionalisierungen am Pektin aufzuzeigen ist es wichtig, ein grundlegendes Verständnis für die Struktur dieses Biopolymers zu bekommen. Erst damit lässt sich erkennen, warum es in der Vergangenheit häufig zu Einschränkungen in der Synthese kam oder Umsetzungen nicht nach bekannten Synthesewegen funktionierten. Im folgenden Kapitel soll auf die unterschiedlichen Strukturmerkmale des Pektins eingegangen und deren makromolekulare Komplexität aufgezeigt werden. Zusätzlich werden die unterschiedlichen intermolekularen Wechselwirkungen des Pektins mit Proteinen und Metallionen, sowie die chemische Stabilität der gebildeten Komplexe erörtert.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Pektin und seine Strukturmerkmale

Als natürliches Polysaccharid ist Pektin hauptsächlich in der primären Zellwand und den mittleren Lamellen von Pflanzen zu finden, wo es für die strukturelle Integrität und Zelladhäsion verantwortlich ist.^[3] Zudem übernimmt es zum Teil auch physiologische Funktionen. Pektin wurde erstmals 1790 von *Vauquelin* in der Tamarinde entdeckt.^[4] Im Jahr 1825 wurde dann der Name „Pectin“ von *Braconnot* vorgeschlagen, welcher sich vom griechischen Wort *πηκτός pektós* = *fest, geronnen* ableitet.^[4,5]

Die Gewinnung von Pektin aus Pflanzenbestandteilen wurde in den letzten 200 Jahren stetig verbessert. Anfänglich mit wässrigen Extraktionsverfahren im neutralen pH-Bereich, zeigte sich schnell, dass saure Extraktionsverfahren die gewünschte Produktqualität immens verbessern können. Obwohl es *Ehrlich* bereits im Jahr 1917 gelang, *D*-Galacturonsäure als Hauptbestandteil von Pektin zu identifizieren, dauerte es weitere 43 Jahre bis *McCready* zeigen konnte, dass der Ausgangsstoff einen großen Einfluss auf die Eigenschaften des extrahierten Pektins mit sich bringt. Die Rohstoffquelle legt die Gelbildungseigenschaften und das Löslichkeitsverhalten der extrahierten Pektine fest.^[6] Aus dieser Feststellung folgte eine Vielzahl von Untersuchungen zur Strukturaufklärung des Pektins. Heute ist bekannt, dass Pektin eines der komplexesten natürlichen Heteropolysaccharide darstellt. Das Rückgrat des Pektins besteht aus α -1,4-verknüpften *D*-Galacturonsäureeinheiten. Diese können teilweise an der 6-Position verestert vorliegen, oder durch α -1,2-verknüpfte *L*-Rhamnoseeinheiten unterbrochen sein. Die Rhamnoseeinheiten sind wiederum mit Neutralzuckern, wie *L*-Rhamnose, *L*-Arabinose und *D*-Galactose verknüpft.^[7,8] Die Hauptelemente der Pektinstruktur sind Homogalacturonan (HG), Rhamnogalacturonan I (RG-I) und Rhamnogalacturonan II (RG-II), Xylogalacturonan, Arabinogalacturonan I und Arabinogalacturonan II, woraus auch die Bezeichnung Multiblock Co-Biopolymer hervorgeht.^[9–11] 2003 beschrieben *Vincken et al.*, dass Pektin aus 17 verschiedenen Monosacchariden mit bis zu 20 unterschiedlichen Verknüpfungen aufgebaut sein kann.^[12,13] Auf die Diversität der Strukturmerkmale und relevante Wechselwirkungen für den im Fokus stehenden Anwendungsprozess wird in den folgenden Kapiteln dezidiert eingegangen.

2.1.1 Homogalacturonan

Zwei von drei Wiederholungseinheiten im Pektin bestehen aus Homogalacturonan, der einfachsten und am häufigsten vorkommenden Wiederholungseinheit im Pektin. Das Polymerrückgrat besteht aus Galacturonsäureeinheiten (GalA), welche über eine α -1,4-glykosidische Bindung verknüpft sind.^[3]

Innerhalb der HG-Struktur können die dort vorliegenden GalA-Einheiten sowohl verestert als auch in Säure- oder Salzform vorliegen, wobei die Verteilung und Häufigkeit von dem Ausgangsstoff abhängt (Abbildung 3). Die HG-Struktureinheit im Zitrus-, Apfel- oder Zuckerrübenpektin besteht aus etwa 70-100 GalA-Einheiten.^[14,15] In der allgemeinen Beschreibung von Pektin nutzt man häufig die Bezeichnungen „smooth region“ und „hairy region“.

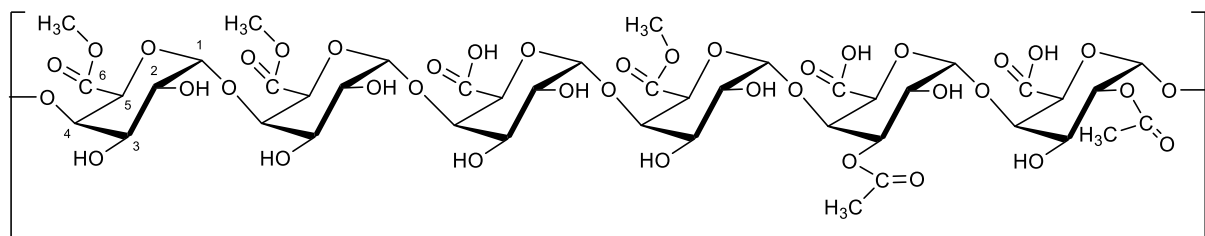


Abbildung 3: Die Struktur einer Homogalacturonan-Einheit, teilweise an C6 als Methyl ester und an Position 2 und 3 acetyliert.

Die HG-Einheit beschreibt hauptsächlich die „smooth region“ des Pektins und kann sowohl am C6 methylerestert sein als auch an C2 und/oder C3 acetyliert vorliegen (siehe Abbildung 3).^[12,14] Die Angabe des Methylveresterungsgrades (DM) kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen in Prozent, bezogen auf die Anzahl an GalA-Einheiten im Pektin, und zum anderen als durchschnittlicher Veresterungsgrad der GalA-Einheiten. Die erste Variante ist bei der Charakterisierung von Pektin üblich und wurde 2004 von *Huisman et al.* erneut forciert.^[16] Die zweite Möglichkeit bezieht sich auf die durchschnittliche Zahl der veresterten Carboxylgruppen pro GalA-Einheit und kann somit zwischen 0 – 1,0 liegen. Obwohl die Verwendung des DS-Wertes für Polysaccharide eine etablierte Methode ist um die Zahl Substituenten zu charakterisieren, ist die Verwendung beim Methylierungsgrad am Pektin nicht geläufig. Im Jahr 2006 beschrieben *Da Silva und Rao* den Methylierungsgrad (DM) für Pektine aus unterschiedlichen Quellen.^[17] Beispielsweise besitzen Apfel- und Zitruspektin einen durchschnittlichen DM > 65 %, im Vergleich dazu besitzt Zuckerrübenpektin einen DM zwischen 55 % - 62 %.^[14] Generell besteht die Annahme, dass Homogalacturonane nativ komplett methylerestert vorliegen.

2 Allgemeiner Teil

Die Verteilung der Estergruppen im Pektin hängt von der Aktivität zahlreicher Enzyme als auch von den Extraktionsbedingungen ab.^[18] Die Verteilung der Methylester über das Rückgrat variiert viel stärker, als durch Ausdrücke wie regelmäßig, zufällig oder blockweise abgedeckt werden kann (Abbildung 4).^[19–23]

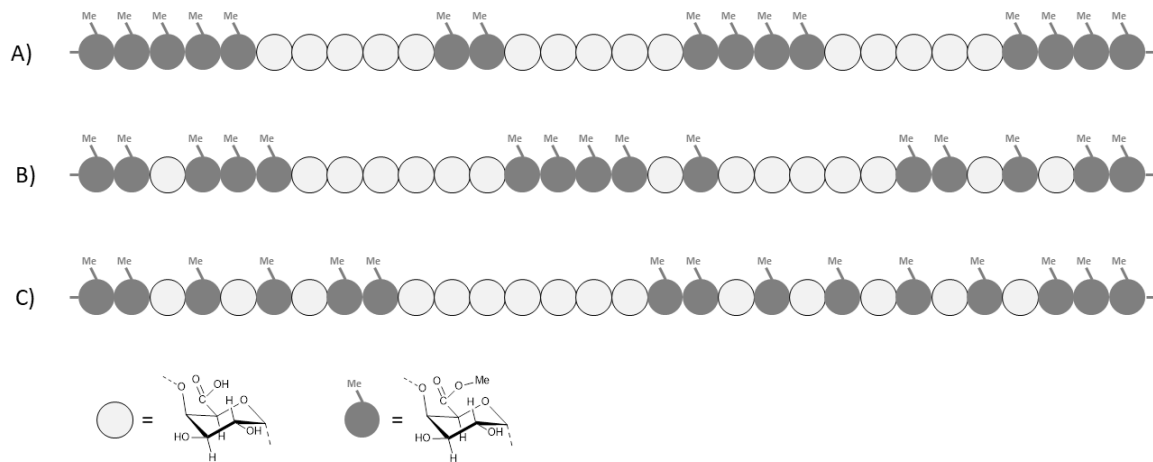


Abbildung 4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verteilung von Methylestergruppen entlang der Homogalacturonaneinheit. A) blockweise Verteilung, welche über B) zu C) stärker alternierend wird. Daas et al. 2000b.

Aufgrund des Methylierungsgrades wird Pektin in hochmethyliertes (HM) und gering methyliertes Pektin (LM) unterteilt. Dabei bezieht sich HM auf einen DM > 0,5 und LM auf einen DM < 0,5.^[9] Der DM eines Pektins ist besonders für die Gelbildungseigenschaften relevant und beeinflusst diese in einem hohen Maß.^[24] Grundsätzlich kann man sagen, dass HM Pektine im sauren Milieu unter Anwesenheit von ca. 55 % Neutralzucker ein Gel ausbilden, LM Pektin hingegen benötigt keinen sauren pH-Wert, sondern die Anwesenheit von multivalenten Metallionen. Unter natürlichen Bedingungen ist dies meist Calcium.^[9,25]

Neben dem Anteil der Methylgruppen hat deren Verteilung einen Einfluss auf die Gelbildung. Wie die Verteilung der Methylestergruppen entlang der Pektinkette die Gelbildung beeinflusst, ist vielfach in der Literatur diskutiert worden.^[26–28] Zusammenfassend kann man sagen, dass die Verteilung intermolekular wie auch intramolekular variieren kann. Diese Beobachtung wurde bereits 1983 von *de Vries et al.* am Beispiel verschiedener Apfelpektine gemacht.^[25] Dabei kann in einer Sequenz mit nicht veresterten GalA-Einheiten eine völlig zufällige oder auch blockweise Verteilung der Methylester zustande kommen.^[9,29,30]

Ein nicht zu vernachlässigender Faktor, der die Gelbildung von Pektinen stark beeinflusst, ist der Anteil an Acetylgruppen an der C2- bzw. C3-Hydroxylfunktion der GalA. Dieser Wert wird

2 Allgemeiner Teil

in der Literatur vorwiegend in Prozent angegeben.^[31] Der D_{Ac} -Anteil variiert von <5 % in Zitrus- und Apfelpektin bis hin zu 35 % in Zuckerrübenpektin. Nach *Osterveld et al.* ist die Verteilung der Acetylgruppen von der Art des Pektins abhängig. Im Zuckerrübenpektin sind ca. 80 - 90 % der Acetylgruppen in der HG Einheit zu finden – im Gegensatz zum Zitrus- und Apfelpektin, wo die Acetylgruppen hauptsächlich in der RG I Struktur vorliegen.^[32,33] Zudem bestimmt der D_{Ac} die Eigenschaften von Pektin zu einem gewissen Grad. Einerseits wurde von *Leroux et al.* beschrieben, dass ein hoher D_{Ac} zur Emulgierfähigkeit von Zuckerrübenpektin beiträgt, während *Siew und Williams* berichten, dass ein hoher D_{Ac} Ursache für schlechte Gelierungseigenschaften von Zuckerrübenpektin ist.^[14,34] Weitere Einflüsse der Acetylierung werden im Abschnitt 3.1 dezidiert aufgeführt und diskutiert.

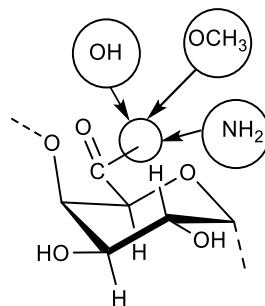


Abbildung 5: Mögliche Funktionalisierungen (Methylester- und Amidgruppe) an der α -D-Galacturonsäureeinheit, der am häufigsten vorkommenden Struktureinheit des Pektins.

Aus industrieller Sicht gibt es zwei Modifizierungsmöglichkeiten der Position 6 am Pektin, die interessant sind. Dazu zählt zum einen die Esterspaltung von natürlich hoch verestertem Pektin (HM), zum anderen die Amidbildung mithilfe von Ammoniak (Abbildung 5). Gering verestertes Pektin liegt natürlich vor, allerdings kann der DM über die chemische Entesterung wesentlich exakter eingestellt werden. Die Amidierung ist ein rein künstlicher Prozess. Natürlich vorkommende Pektine mit Amidgruppen sind nicht bekannt.

2.1.2 Rhamnogalacturonan I

Die Rhamnogalacturan I-Struktureinheit macht ungefähr 28 % der gesamten Pektinstruktur aus.^[3] Das Rückgrat der RG-I-Struktureinheit ist aus Sequenzen von $[-\alpha$ -D-GalA-1,2- α -L-Rha-1-4-]_n Disacchariden aufgebaut, die Kettenlänge variiert dabei in Abhängigkeit vom Ausgangsstoff.^[35] Bei der Untersuchung von isolierten RG I-Einheiten aus kultiviertem Ahorn im Vergleich zu Zuckerrüben geht der Unterschied deutlich hervor. Die Ahorn-RG I-Einheiten

2 Allgemeiner Teil

bestehen aus 100-300 Wiederholungseinheiten des Disaccharides [GalA-Rha]. Im Gegensatz dazu bestehen die Zuckerrüben-RG I-Einheiten aus maximal 20 alternierenden Rha- und GalA-Resten.^[9,36]

Die RG I-Struktureinheit ist stark verzweigt. Zusätzlich kann das Rückgrat an der C4-Position mit neutralen oder sauren Oligosacchariden substituiert sein. *Voragen et al.* zeigten 2009, dass für die Substitution sowohl Arabinose (Ara) und Galaktose (Gal) oder Arabinogalactan I als auch Arabinogalactan II typisch sind.^[10] Die Struktur von Arabinogalactan II ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund einer Vielzahl an Neutralzuckern und der damit einhergehenden starken Verzweigung, wird die RG I-Einheit auch als „hairy region“ bezeichnet. Erwähnenswert ist zudem, dass die Ara-Einheiten an der C2-, C3- sowie C5-Funktion zum Teil mit Ferulaten (Abbildung 6) substituiert sein können, wohingegen die Galaktose eher Substitutionen an der C6-Funktion aufweist.

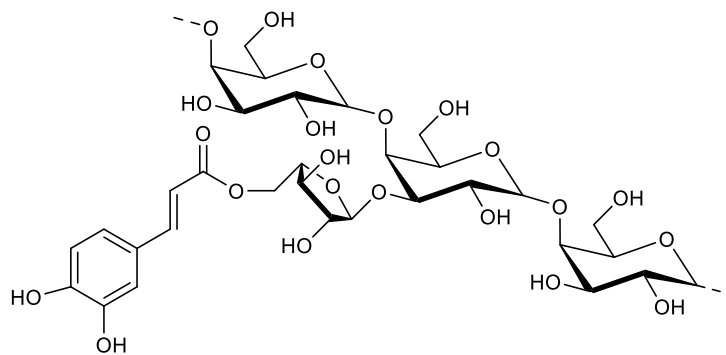


Abbildung 6: Bindung von Ferulasäure an L-Arabinose in der Arabinogalactan I-Struktur.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Ferulate sich zu Dihydroferulaten reduzieren lassen und somit in der Zellwand eine Vernetzung von zwei oder mehreren RG I-Einheiten zu Stande kommen kann.^[37] Aus derselben Studie ging hervor, dass die GalA-Reste in der RG I-Struktur keine Methylesterungen aufzeigen. Dieses Ergebnis wurde mehrfach bestätigt.^[38]

Im Gegensatz dazu kann die RG I-Struktur an den 2- und/oder 3-Positionen am GalA-Rückgrat acetyliert sein. Das wurde durch NMR-Untersuchungen bestätigt.^[18,31,39,40] *Kouwijzer et al.* (1996) berechneten, dass die 2-Position energetisch begünstigt ist und den wichtigsten Beitrag bei der Acetylierung bringt.^[41]

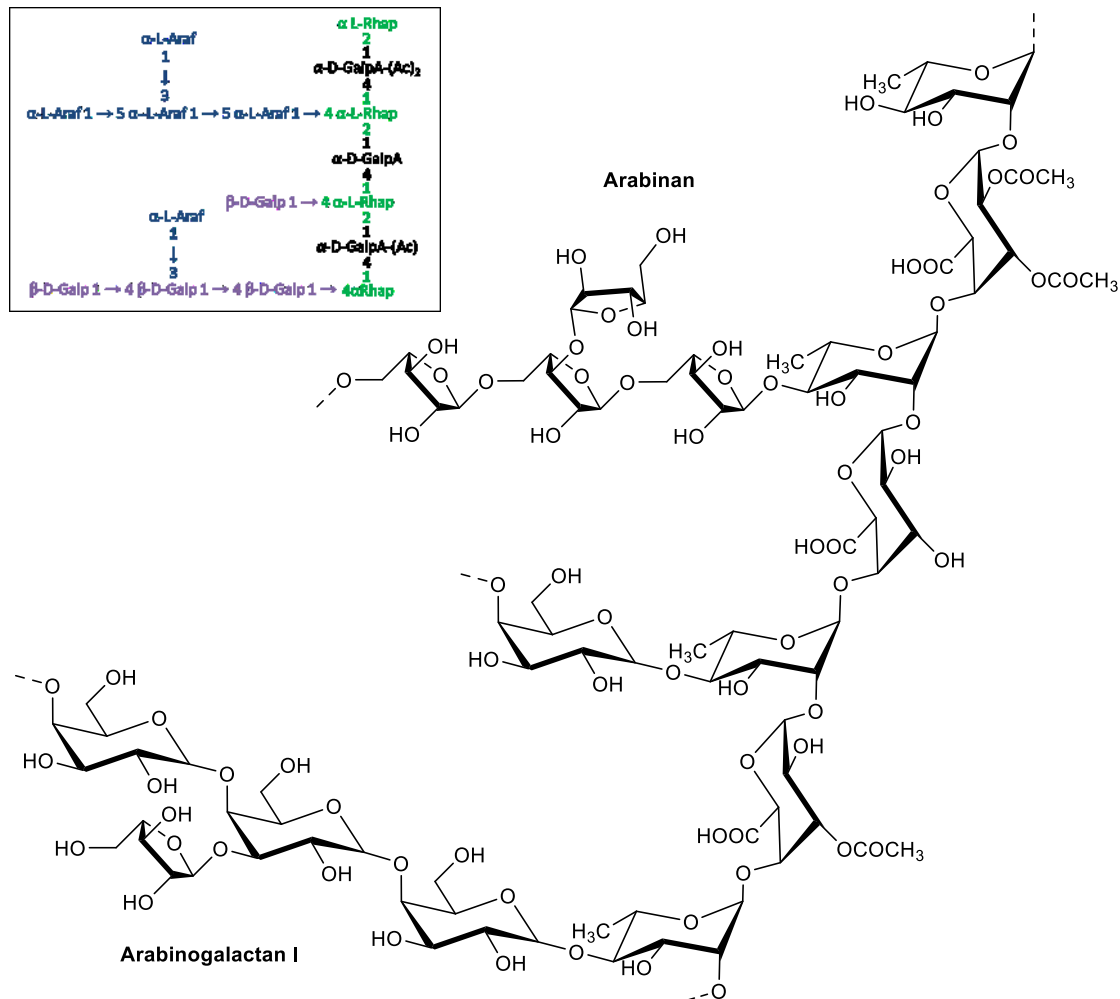


Abbildung 7: Die Struktur des RG I-Rückgrates und repräsentativer Seitenketten. Die Struktur von RG I besteht aus α -(1,2)-L-Rhamnose und α -(1,4)-R-Galacturonsäure-Wiederholungseinheiten. Als Seitenketten sind α -(1,5)-L-Arabinose (Arabinogalactan), β -(1,4)-Galactose und Arabinogalactan I gezeigt. Arabinogalactan I besteht wiederum aus β -(1,4)-Galactoseketten mit α -(1,3)-L-Arabinose-Verzweigungen.

2.1.3 Rhamnogalacturonan II

Rhamnogalacturonan II (RG II) oder auch „Higly Branched Galacturonan“ (HBG), erstmals 1978 von *Darvill et al.* beschrieben, konnte aus der primären Zellwand von Dicotyledonen, Monocotyledonen und Gymnospermen extrahiert werden.^[42] Die RG II-Einheit, die nur zu 10 % im Pektin vertreten ist, hat eine verhältnismäßig geringe Molekülmasse (5 - 10 kD), besitzt aber die komplexeste Struktur.^[43] RG II enthält elf verschiedene Glycosylreste (Abbildung 8). Das Grundgerüst von RG II enthält mindestens acht 1,4-verknüpfte α -D-Galacturonsäure-Reste (GalA). Schematisch betrachtet sind zwei strukturell unterschiedliche Disaccharide (C und D) am C3 der Hauptkette, zusätzlich sind zwei strukturell unterschiedliche Oligosaccharide (A und B) am C2 der Hauptkette gebunden.^[42,44]

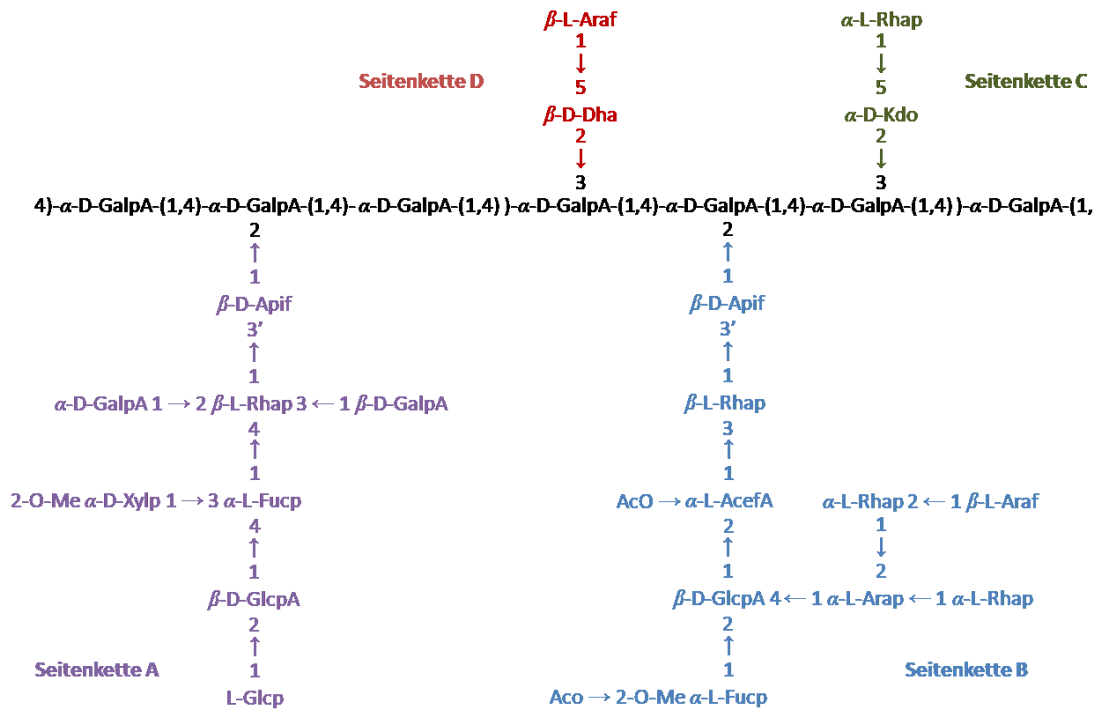


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Rhamnogalacturonan II-Struktur. Die entsprechenden Di- bzw. Oligosaccharid-Seitenketten sind farblich unterlegt.^[45]

Es wird angenommen, dass die RG II-Einheit neben der Monomerform gleichermaßen als Dimerform in der Zellwand vorliegen kann.^[35] Die RG II-Dimerbildung ist ein Selbstorganisationsprozess, der in Abwesenheit eines katalytischen Proteins stattfindet und stattdessen durch Bor ein wesentliches Spurenelement für das Pflanzenwachstum erleichtert wird.^[43] Trotz der Komplexität zeigt sich, dass die RG II-Struktur eine äußerst wichtige Rolle für die Funktion der Zellwand spielt, wie in Studien von *Mohnen* und *Willast* deutlich wird. Untersuchungen zeigten, dass das Dimer eine einzelne Boratdiester-Verknüpfung enthält und dass der Ester zwischen dem Apiosylrest in Seitenkette A jeder Monomeruntereinheit gebildet wird.^[46–48] Der Boratester ist chiral und somit können sich zwei Diastereoisomere bilden (Abbildung 9). Es ist nicht bekannt, welches der zwei Isomere in natürlichem RG II vorkommt.^[49] Eine erstaunlich hohe Menge an RG II besitzt Rotwein (100 - 150), mg L⁻¹ da dieses während des Fermentationsprozesses gelöst wird. Das enthaltene RG II liegt nahezu vollständig als boratvernetztes Dimer vor.^[50]

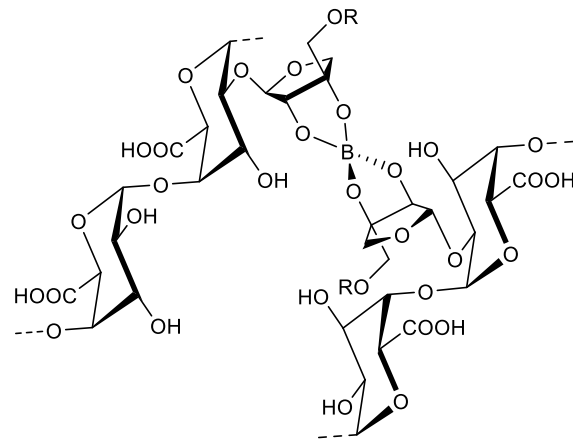


Abbildung 9: Zwei Apiosylreste durch einen Boratdiester verknüpft. Das Boratom ist chiral und es können zwei Diastereoisomere (Bis [3C- (hydroxymethyl) - β -L-threofuranosid] - (R) -2,3: 2', 3'-Borat) und (Bis [3C- (hydroxymethyl) - β -L-threofuranosid] - (S) -2,3: 2', 3'-Borat auftreten. (O'Neill et al., 2004).

2.1.4 Weitere Strukturelemente

Weitere Strukturelemente im Pektin sind Xylogalacturonan, substituiertes Homogalacturonan oder verschiedene Arabinogalactane. Xylogalacturonan (XGA) befindet sich gewöhnlich in Lagergeweben von Fortpflanzungsorganen, wo es spezialisierte Funktionen aufweist, aber auch in nicht-reproduktiven Organen, wie Wurzeln, Stämmen und Blättern. Dies konnte von *Yapo et al.* in verschiedenen Pflanzen identifiziert werden.^[11] Die XGA-Einheit besteht aus einem α -D-1,4-GalA-Rückgrat, welches durch einzelne β -D-Xylose-Einheiten oder mit längeren β -D-Xylan-Ketten substituiert ist.^[10] Die längeren β -D-Xylan-Ketten können mit Fructose, Galactose und Arabinose substituiert sein.^[11] Der Anteil von β -D-Xylose-Einheiten innerhalb der XGA-Struktur variiert von ~20 % – 100 % und ist stark abhängig vom Ausgangsstoff.^[9] Gleichmaßen kann die XGA-Einheit zwischen 40 – 90 % mehtylverestert sein. Die Ester sind dann gleichmäßig auf der GalA-Struktur angeordnet. Die Anwesenheit von Acetylgruppen konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden und beruht nur auf theoretischen Annahmen von *Voragen et al.*^[10]

Neben Xylogalacturonanen finden sich in Pektin höherer Pflanzen variierende Arabinogalactane. Bei diesen kann das Galactan-Grundgerüst mit verschiedenen Mengen an Arabinose oder Galactose substituiert sein. Arabinogalactan I (AG I) wurde bereits im Zuge der Rhamnogalacturonan I-Einheit dargestellt (Abbildung 11) und besteht aus 1,4-verknüpften β -D-Galactose-Einheiten, wobei an der C3-Position α -L-Arabinose gebunden

ist.^[51] Nach *Coenen et al.* ist das Galactan-Grundgerüst neben der C3-Substitution auch am C6 mit α -L-Arabinose substituiert.^[52]

Arabinogalactan II (AG II) besteht dagegen aus einem 1,3-verknüpften β -D-Galactan-Grundgerüst, das mit β -D-Galactose-Einheiten sowie kurzen oder langen Seitenketten von α -L-Arabinose-Resten stark verzweigt ist. Dieses pektinartige Polysaccharid ist hauptsächlich mit Proteinen wie Arabinogalactan-Proteinen assoziiert. Diese sind reich an Prolin oder Hydroxyprolin, Alanin, Serin und Threonin. Der Anteil der Arabinogalactan-Proteine liegt zwischen 3 - 8 %.^[9,14]

2.1.5 Die makromolekulare Struktur von Pektin

Im Jahr 1934 wurde aus Zitrusfrüchten gewonnenes Pektin als hauptsächlich unverzweigte Polygalacturonsäure dargestellt.^[53] Diese idealisierte Ansicht wurde in Handbüchern bis in die neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts verwendet. Die gesammelten Daten der Pektinstruktur haben sich in den letzten Jahrzehnten drastisch verändert und damit auch die Sicht auf die Pektinstruktur. Dabei bestätigt sich, dass Pektin ein äußerst komplexes Makromolekül ist und die Vereinigung aller Informationen in einem Strukturmodell eine große Herausforderung darstellt.

Jede einzelne Struktureinheit, dazu zählen hauptsächlich HG, RG I und RG II, ist miteinander kovalent verbunden und bildet damit die makromolekulare Struktur von Pektin. Die makromolekulare Struktur ist äußerst komplex und stark abhängig von der Quelle des Biopolymers. In der Vergangenheit wurden meist zwei hypothetische Modelle zur Beschreibung des strukturellen Aufbaus genutzt. Zum einen das linear fortlaufende Modell (das sog. „smooth and hairy regions model“) und zum anderen das des RG I-Rückgrates.

Das erste Modell wurde von *Keegstra et al.* im Jahr 1973 aufgestellt, wobei Pektin aus Bergahornzellen isoliert und als RG-Struktureinheiten definiert wurde, bestehend aus α -1,4-verknüpften GalA- und Rha-Einheiten die Arabinanseitenketten tragen.^[54]

Das durch *de Vries et al.* im Jahr 1981 linear fortlaufende Modell besagt, dass das komplexe Pektingerüst aus einer linearen Kette besteht, welche zwei Unterstrukturen ausweist. Zum einen die „smooth region“, welche homogen aus HG Einheiten besteht und zum anderen die „hairy region“ welche aus RG I-Einheiten als Rückgrat aufgebaut ist und mit einer Vielzahl von Neutralzuckern substituiert sein kann.^[55] Das Pektinrückgrat ist aus einer alternierenden

2 Allgemeiner Teil

Abfolge von „smooth regions“ und „hairy regions“ aufgebaut. Typische Neutralzucker für die RG I-Einheit können verzweigte oder lineare Galactan- oder Arabinanketten sein.^[56] Das lineare Modell (Abbildung 10) beschreibt den strukturellen Aufbau von Pektin in Zellwänden unabhängig vom Ausgangsstoff.^[11]

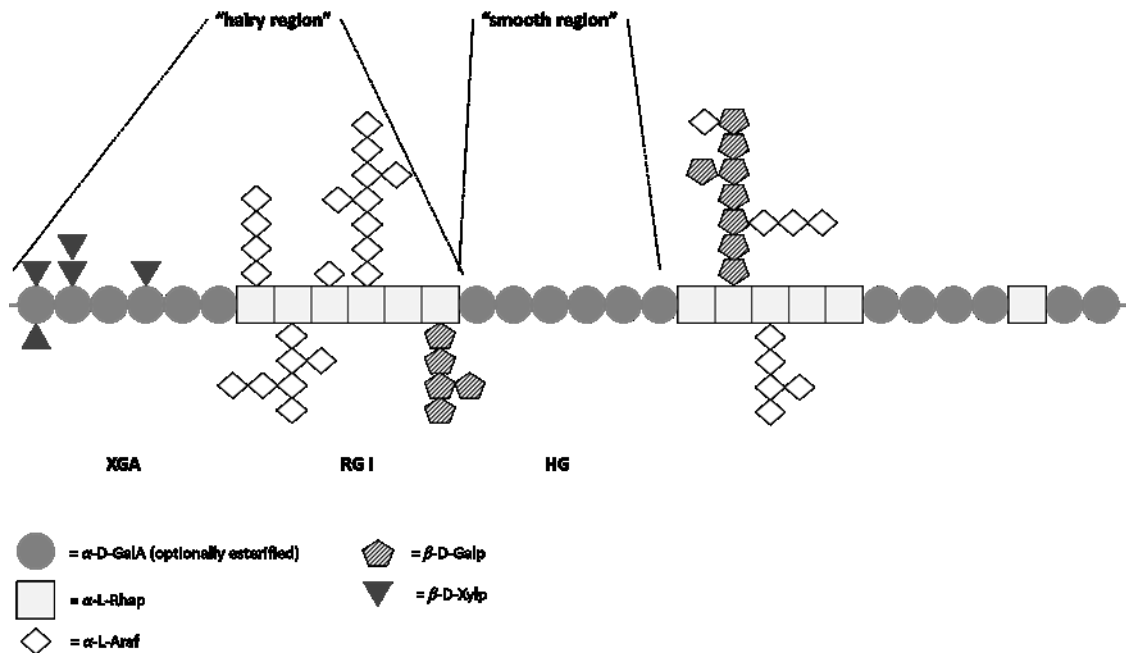


Abbildung 10: Lineares Modell von Pektin. Gezeigt sind die unverzweigten HG-Einheiten und die mit Neutralzuckern verzweigten RG I-Einheiten aus Zitruspektin (adaptiert v. Yapo, 2011).^[11]

Das RG I-Rückgratmodell von *Vincken et al.* aus dem Jahr 2003 wurde entwickelt, um den Mangel an möglichen Erklärungen bestimmter Ergebnisse zu überwinden. Dazu zählen die größere Resistenz gegenüber Pektinasen und ein kleineres hydrodynamisches Volumen (Abbildung 11).^[13]

In diesem Modell wird von einem RG I-Rückgrat mit HG und XGA-Seitenketten ausgegangen. Aufgrund der starken Verzweigung wurde dieses Modell von *Vincken et al.* auch als „molecular brush“ bezeichnet. Es unterscheidet sich vom linearen Modell, da ausschließlich RG I-Einheiten im Rückgrat zu finden sind. Die Behandlung von Pektin mit Exo-Polygalacturonase und Endo-Polygalacturonase führt zu einer beträchtlichen Freisetzung von XGA mit einem geringen Abbau in der Molekularmasse, welches den Rückschluss auf die Zusammensetzung der Seitenkette zulässt. Darüber hinaus deutet das hohe GalA-zu-Rhamnose-Verhältnis im Pektin an, dass ein Teil der GalA-Reste in den Seitenketten von RG I

2 Allgemeiner Teil

vorhanden sein könnte, was einen weiteren Beweis für XGA als Seitenkette liefert.^[10,52] Diese Ergebnisse bilden die Grundlage der Rückgrat-Hypothese.

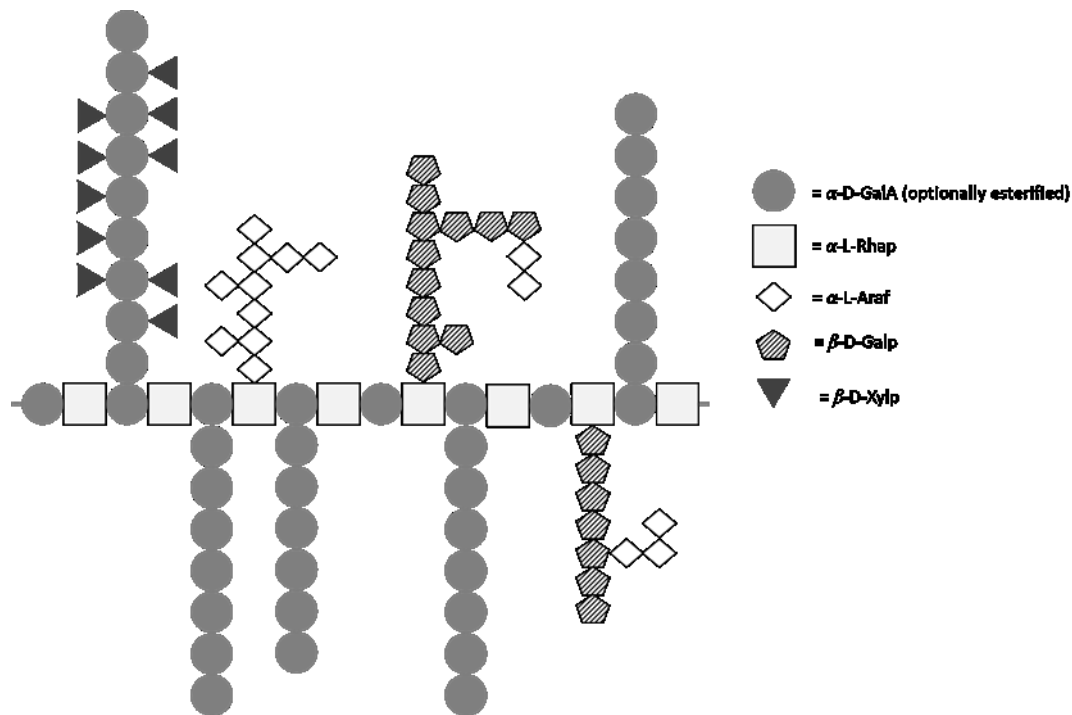


Abbildung 11: Schematische Darstellung des RG I-Modells, die das RG I-Rückgrat und die Positionierung von HG und XGA sowie Arabinanen I-Seitenketten zeigt (adaptiert v. Yapo, 2011).^[11]

Zusätzlich wurde im Jahr 2011 von Yapo das „living thing-like“ Modell postuliert.^[11] Dieses Modell berücksichtigt sowohl das lineare zusammenhängende Modell als auch das RG I-Backbone-Modell. Es wird angenommen, dass das Rückgrat dieses Modells abwechselnd aus zwei linearen HG-Elementen und einem RG I-Kern besteht. Die RG I-Einheit ist mit Seitenketten substituiert, an welche weitere Galacturonane gebunden sein können außer RG II. Die beiden HG-Blöcke können aufgrund der Flexibilität der (1,2)-verknüpften α -L-Rhamnose-Einheiten, über die sie an den RG I-Kern gebunden sind, in einer horizontalen oder vertikalen Position vorliegen. HG-Blöcke sind auch mit RG II-Blöcken verbunden, um die „Wurzeln“ des Pektin-Komplexes zu bilden, wie in Abbildung 12 dargestellt. Dieses Modell deutet auf die möglichen Dimerisierungen von RG II hin.^[11,37]

Die Konformation der verschiedenen Kettentypen im Pektin wurde von Braccini *et al.* 1999 und Perez *et al.* 2000 zusammengefasst. Die α -(1,4)-Verknüpfung zwischen Galacturonsäure-Einheiten weist eine eher begrenzte sterische Flexibilität auf, allerdings ist diese größer als von Cellulose und deren Analoga.^[57–59] Diese durch NMR-Messungen und Modellierung von Oligosacchariden festgelegte Verknüpfungsgeometrie, wurde von einer Vielzahl von

2 Allgemeiner Teil

Forscher zwischen 1991–1995 postuliert und sagt aus, dass α -(1,4)-Galacturonan-Ketten eine regelmäßige helikale Konformation ausbilden, die durch relativ niedrige Energiebarrieren getrennt sind.^[60–66]

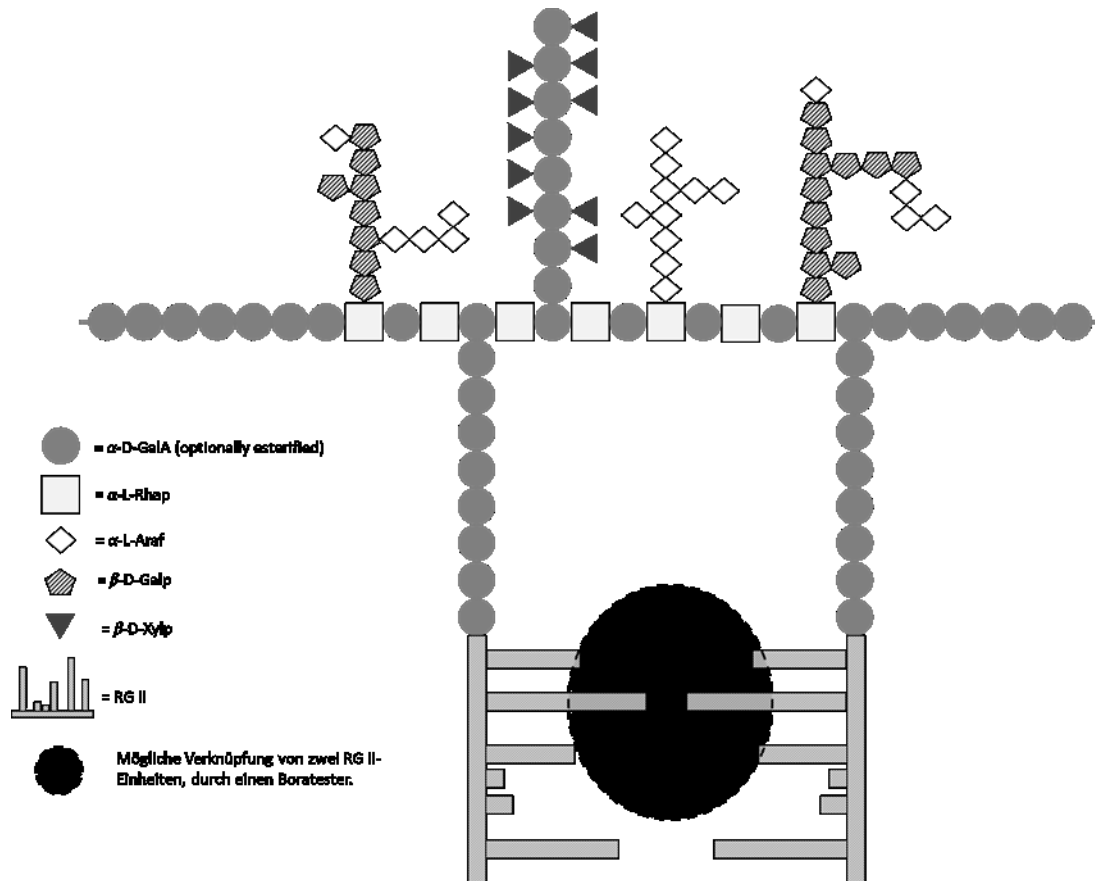


Abbildung 12 Schematische Darstellung des „living thing-like“ Modells mit zwei unverzweigten HG-Blöcken, welche einen RG I-Kern umfassen. Diese sind abwechselnd miteinander verbunden. Zwei RG II-Einheiten sind am reduzierenden Ende der beiden abgewinkelten HG-Blöcke angebunden (adaptiert v. Yapo, 2011).^[11]

Dazu gehörten zweifache (2_1) Helices, in denen alternierende Monomerreste in entgegengesetzte Richtungen weisen. Cellulose bildet auch eine zweifache, aber fast flache Helix, wohingegen die diaxiale α -(1,4)-Galacturonosyl-Verknüpfung im Pektin die Kette in eine viel weniger ausgedehnte Zick-Zack-Form zwingt. Außerdem können sich die Galacturonanketten aus dieser Konformation in beide Richtungen verdrehen, um dreifache Helices mit drei Monomereinheiten pro 360° nach rechts oder links (3_1 oder 3_2) zu bilden. Scavetta et al. fanden 1999 glykosidische Konformationen, die sowohl den 2_1 als auch 3_1 helikalen Galacturonansegmenten in der Kristallstruktur eines Pektinlyase-Enzyms ähnelten. Galacturonanketten in Lösung explorieren den gesamten Konformationsraum der helikalen Formen, aber die klassische Zirkulardichroismus-Studie von Morris et al. 1982 bestätigte,

dass Konformationen nahe der zweifachen helikalen Form bei Galacturonanen mit niedrigem DM in Lösung überwiegen, zumindest bei niedrigen Konzentrationen, Raumtemperatur und neutralem pH-Wert.^[67] *Gilsenan et al.* 2000 lieferten zusätzliche kalorimetrische Beweise dafür, dass die zweifache Helix unter neutralen Bedingungen dominiert, dass jedoch die 3_1 -Helix in Lösung unter $\text{pH} < 3$ an Bedeutung zunimmt, besonders wenn die Temperatur gesenkt wird.^[68] Isolierte Galacturonanketten sind relativ steif. Modellierungsstudien sagen eine Persistenzlänge im Bereich von 50-100 Å voraus, die der Länge von 10-20 Wiederholungseinheiten entspricht. Diese Annahme gilt nach *Bouthering et al.* nur, wenn die Flexibilität der Monomereinheiten selbst berücksichtigt wird, ansonsten wäre die Kette wesentlich steifer, wie *Ruggiero et al.* postulierten.^[66,69] Diese Vorhersagen stehen im Einklang mit viskosimetrischen Messungen, Größenausschlusschromatographie und Neutronenstreuung.^[70-76] Wenn die Carboxylgruppe ionisiert vorliegt, erhöht sich die Abstoßung zwischen den Ladungen, wodurch sich die Polymerkette versteift und sich die Persistenzlänge bis zum oberen Ende dieses Bereichs erhöht.^[69,77] Die Konformation dieser steifen Galacturonankette wurde im Allgemeinen als glatte, leicht gekrümmte Windung dargestellt, aber *Catoire et al.* schlugen 1997 vor, dass gerade 2_1 -spiralförmige und 130 Å lange Segmente, verbunden mit vorübergehenden, thermisch induzierten Knicken, ein realistischeres Modell darstellen könnten.^[78] Weitere Konformationen auch unter Einbezug der RG-Bereiche wurden ausführlicher von *Seymour et al.* beschrieben.^[9]

2.2 Interaktionen und elektrostatische Wechselwirkungen von Pektin

In Pflanzen finden sich unterschiedliche Verknüpfungen und Wechselwirkungen zwischen Pektinmolekülen und anderen Zellbestandteilen wie Proteinen, Hemicellulosen, Phosphaten und phenolischen Verbindungen.^[35] Neben den in der Zellwand auftretenden Vernetzungsstellen wie dem RG II-Borat-Komplex kann das kommerziell extrahierte Pektin inter- und intramolekular durch verschiedene Mechanismen interagieren. Beispielsweise lässt sich Pektin durch di- oder trivalente Ione vernetzen. Ferulesterverbindungen können ebenfalls zu Vernetzung mit anderen Molekülen wie Proteinen führen. Diese Wechselwirkungen spielen eine Schlüsselrolle in der Funktionalität von Pektin. Dieser Abschnitt konzentriert sich daher auf Pektin-Wechselwirkungen, die durch Ionen,

2 Allgemeiner Teil

Feruloylgruppen, Wasserstoffbrücken und Wechselwirkungen mit Proteinen vermittelt werden.

Pektin ist ein Makromolekül, das eine große Anzahl ionisierbarer Carboxylgruppen enthält und daher ein Polyelektrolyt mit einer starken Affinität für Gegenionen darstellt.^[17] Je nach pH-Wert können die nicht methylveresterten Carboxylgruppen negativ geladen sein und daher mit mehrwertigen Ionen, wie zum Beispiel Calcium, komplexieren. Calcium-Ionen können durch Pektin mit einem geringen DM im pH-Bereich von 3,5 - 7 komplexiert werden. Dies beinhaltet die Bildung von Übergangsbereichen, welche durch das geordnete Polymerrückgrat der Galacturonane erzeugt werden. Die GalA-Reste verschiedener Ketten sind durch ionische und elektrostatische Wechselwirkungen der Carboxylgruppen mit Calcium verbunden. Diese Wechselwirkungen werden im sogenannten „egg-box“-Modell zusammengefasst (Abbildung 13).^[70,79] Die Bindung von Calcium-Ionen kann auch über andere funktionelle Gruppen gefördert werden, wie Hydroxylgruppen sowie von neutralen oder sauren Zuckern.^[80] Beim Zusammenspiel mit sauren oder neutralen Zuckern erfolgt eine Reduktion der Hydrathülle am Pektin, was für die Komplexierung förderlich ist. Die Bildung eines Calciumpektinates oder Komplexierung anderer bi- und trivalenten Kationen in ausreichender Menge führt bei einem pH-Bereich von 3,5 - 7 zu einer Gelierung.^[81]

Mehrere Faktoren, einschließlich der Verteilung der Methyl- und Acetylgruppen entlang der Polysaccharidkette, beeinflussen die Bildung von Pektinatkomplexen. Zum Beispiel ist die Calciumionen-induzierte Bindung zu vernachlässigen, wenn mehr als 40 % der Carboxylgruppen zufällig verestert sind.^[79] Auch ein hoher D_{Ac} in Zuckerrüben-Pektin reduziert die Wechselwirkung der einzelnen Pektinmoleküle mit Calciumionen signifikant.^[82] Darüber hinaus wird die Anwesenheit von Rhamnose in der Primärstruktur des Pektins als nicht kompatibel mit den durch GalA-Reste gebildeten Verbindungszonen betrachtet. In Apfel- und Zitruspektin ist Rhamnose hauptsächlich in den „hairy regions“ zu finden, während in Zuckerrüben-Pektin einige Rhamnose-Einheiten die „smooth“ HG-Struktur häufiger unterbrechen, wie in Abbildung 10 dargestellt. Diese räumliche Einschränkung behindert die molekulare Orientierung, welche für die Verknüpfungszonen notwendig ist.^[83] In Abwesenheit von multivalenten Metallionen können intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Ketten durch Wasserstoffbrückenbindungen oder über hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt werden. Mehrere Möglichkeiten zum Ausbilden von Wasserstoffbrückenbindungen sind aufgrund der Sauerstoffatome (Hydroxy- oder

Carboxygruppe sowie Pyranosesauerstoff) und Hydroxylwasserstoffe der Pektinkette vorhanden. Diese Bindungen werden durch die Konformation benachbarter Galacturonsäure-Einheiten begünstigt. Während Wasserstoffbrücken relativ schwach und leicht zu spalten sind, neigen sie in großer Zahl dazu, das Pektinaggregat zu stabilisieren. *Van Buren* zeigte 1991, dass Methylestergruppen an hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt sind, was wiederum die Grenzflächenspannung verringert.^[80] HG-Ketten können auch durch Harnsäureester miteinander vernetzt sein. In Spinatpflanzen sind 5 % der GalA auf diese Weise vernetzt.^[9] Es wird angenommen, dass einige Pektinmethylesterasen (PMEs) Reaktionen katalysieren, die zur Verknüpfung einer Carboxygruppe mit einer OH-Gruppe eines GalA-Restes einer anderen Kette führen kann.^[10] Ebenfalls für die Gelbildung in Zuckersäuregelen (Nebervalenzgele) sind die Wasserstoffbrückenbindungen unabkömmlich.^[81] Auf spezielle Parameter zur Gelbildung wird im folgenden Kapitel eingegangen.

2.2.1 Eigenschaften von Pektingelen

Für die Kettenagglomeration und die Ausbildung von Verbindungszonen gibt es eine Vielzahl von Studien. Galacturonanketten können sich je nach ihrer Struktur auf verschiedene Arten miteinander verbinden. Die bekannteste Aggregation ist das Calcium-stabilisierte „egg-box“-Dimer, das erstmals in der Kristallstruktur des verwandten Polymers *L*-Guloronan gefunden und von *Morris et al.* auf Calcium-Galacturonan-Gele 1982 erweitert wurde (Abbildung 13).^[67,84]

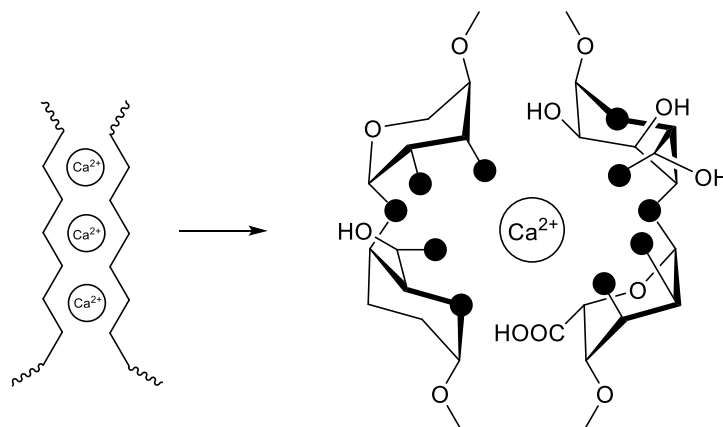


Abbildung 13: Darstellung des „egg-box“-Modells (links) sowie die Koordination eines Calciumatoms (rechts), adaptiert aus dem Calcium-Guluronatmodell von Braccini und Pérez von 2001. Die dunklen Kreise repräsentieren die Sauerstoffatome, welche an der Koordination des Calcium-Ions beteiligt sind.^[85]

2 Allgemeiner Teil

In der "egg-box"-Dimerstruktur befinden sich die Ketten in einer 2_1 -helikalen Konformation, wobei in Lösung die 3_1 -Konformation am wahrscheinlichsten ist. Es gibt nur einen geringen Unterschied der freien Energie zwischen Aggregaten in diesen beiden Konformationen.^[86,87] "Egg-box"-Verknüpfungsbereiche scheinen bei Gelen mit niedrigen Polymerkonzentrationen bevorzugt zu sein, während hohe Polymerkonzentrationen und ein niedriger pH-Wert die Bildung von Tetrameren oder Kettenaggregaten ähnlicher Größe in begünstigten 3_1 -helikalen Strukturen fördern.^[67,68,86,88,89]

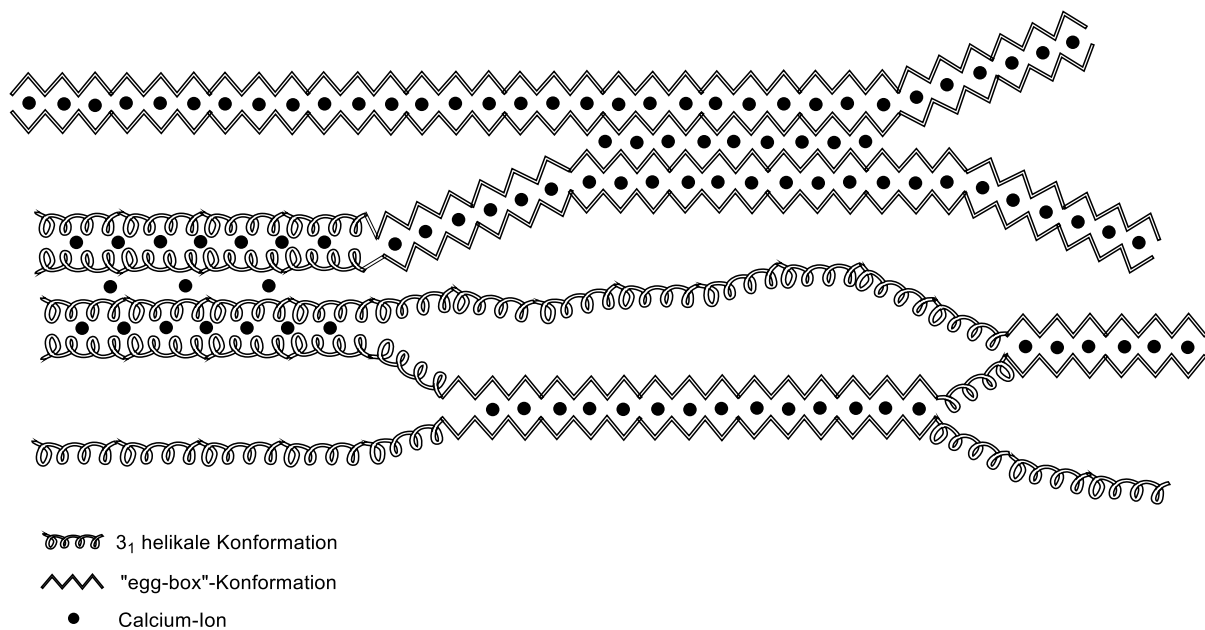


Abbildung 14: Schema der Bindungszonen eines Calcium-Pektinat-Gels nach dem „cable model“, adaptiert nach Goldberg et al. 1996. Dabei sind zwei Aggregationen dargestellt, zum einen die „egg-box“-Konformation, zum anderen die Ausbildung von 3_1 -helikalen Ketten-Konformationen.^[90]

Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen legen nahe, dass eine Mischung der beiden helikalen Formen vorliegt.^[91,92] Das "cable"-Modell von Goldberg et al. 1996 summiert diese möglichen Wechselwirkungen (Abbildung 14) auf.^[90] Calcium-Ionen werden im Gelzustand von Galacturonanen stärker gebunden als in Lösung. Quantitativ wurde die Calciumbindung an einer Vielzahl von physikalischen Modellen beschrieben, von denen sich einige auf den Lösungszustand, andere auf den Festkörper beziehen.^[93–95] Dies veranschaulicht die Sonderstellung von Gelen als Zustand der Materie. Die schwierigste Frage ist, wie die kationenspezifische Bindungswechselwirkung vom elektrostatischen Beitrag zur Bindungsenergie getrennt werden kann. Dass einige Ionen stärker gebunden sind als andere mit derselben Valenz, steht fest: Pb^{2+} und Cu^{2+} sind viel stärker gebunden als Ca^{2+} ,

2 Allgemeiner Teil

das wiederum stärker gebunden ist als Mg^{2+} .^[63,96–98] Auch bei der Bindung einwertiger Kationen gibt es Unterschiede.^[99,100]

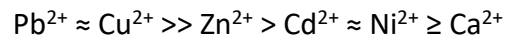


Abbildung 15: Bindungsaffinität von Zitruspektin bzw. LM Pektin in Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen, nach Dronnet et al. 1996.^[96]

Um das Verhalten von stärker gebundenen Kationen zu beschreiben, wurde ein Selektivitätskoeffizient eingeführt.^[96,101] Dieser setzt jedoch voraus, dass die elektrostatische Wechselwirkung für alle Kationen derselben Valenz die gleiche ist; eine Annahme, die möglicherweise nicht korrekt ist. Beschreibt man die lineare Änderungsdichte von Ketten, welche eine Bindungszone ausbilden, mit Hilfe des Manning-Parameters, so kann man davon ausgehen, dass die innere Änderungsdichte die negativen Ladungen aller Ketten in der Kreuzungszone einschließt.^[102,103] Die Stärke der rein elektrostatischen Bindung und das Ausmaß der Kationenbindung würden dann im Verhältnis zur Anzahl der Ketten in der Bindungszone erhöht. Dies würde mit der Beobachtung einer erhöhten Affinität von Kationen in Pektin Gelen als in Lösung übereinstimmen.^[104] Wenn die Anzahl der Ketten in der Bindungszone mit der Größe und Hydratation des Kations variiert, beeinflusst dies die Stärke der Kationenbindung unabhängig von einer selektiven helikalen Struktur.

Einen zusätzlichen Einfluss auf die Ausbildung von Helices hat das Vorhandensein von Acetylgruppen am Rückgrat, dies kann zu einer negativen Beeinflussung der Kationenbindung führen, auch wenn die Gelbildung noch gegeben ist.^[105,106] Ein Chelationseffekt ist jedoch vorhanden, was durch Modellstudien von *Braccini et al.* 1999 gezeigt werden konnte. Daraus ging zudem hervor, dass bei beiden helikalen Formen des Pektinats die Hydroxy- und Carboxygruppe korrekt positioniert sind, um mit der Koordinationsgeometrie des Ca^{2+} -Ions wechselwirken zu können. Dadurch werden bis zu vier der sechs zugehörigen Wassermoleküle aus dem Komplex verdrängt.^[57] Bei der Feinstrukturanalyse mittels Röntgenabsorption haben *Alagna et al.* 1986 herausgefunden, dass Calciumionen in Pektinatgelen tatsächlich in dieser Geometrie koordiniert sind.^[107] FTIR-Spektren von Filmen bestätigten diese Koordination für ein breites Spektrum von Kationen.^[108] Im Zusammenhang mit der Abwasseraufreinigung und dem Nutzen als

2 Allgemeiner Teil

Flokkulationsmittel wurde eine Reihe weiterer Kationen neben dem Calciumion untersucht.^[98,109,110]

Auch die Viskosität von Pektinlösungen wird durch eine Vielzahl von Parametern und Interaktionen beeinflusst, wie das Molekulargewicht, die Menge und das Verteilungsmuster von Substituenten (C6-Methylestergruppe, C6-Amidgruppen und O-Acetylgruppen). Zusätze von Kationen haben, bereits vor einer Gelierung des Biopolymers, einen starken Einfluss auf die Viskosität in Lösung. Weitere für die Viskosität von Polyelektrolytlösungen nicht zu vernachlässigende Parameter, sind der pH-Wert des Systems, das Vorhandensein gelöster Feststoffe oder Lösungsmittel, die Ionenstärke, die Anwesenheit von Metallionen, die Pektinkonzentration und die Temperatur. Die Beziehung zwischen diesen Parametern und der daraus resultierenden Rheologie ist komplex, da sie durch inter- sowie intramolekulare Assoziationen beeinflusst wird. Zu diesem Thema gab es in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Studien, wobei diese hier nicht näher ausgeführt werden sollen.^[71,111–119]

Pektine mit hohem Methoxyanteil (DM > 50%) bilden Gele hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen bei einem pH-Wert von $\leq 3,5$ und in Gegenwart von aktiv wasserverdrängenden Feststoffen wie Zucker (mind. 55 %, z.B. Saccharose).^[120] Diese Gele entstehen erst nach der Abkühlung, da die Komponenten in der Wärme gemischt werden (z.B. Marmeladenherstellung). Die Gelierung von HM-Pektin zeigt eine Hysterese in dem Sinne, dass die Schmelztemperatur höher ist als die bei der Herstellung notwendige. Bei typischen Verwendungen ist die Schmelztemperatur so hoch, dass es aus praktischen Gesichtspunkten unmöglich ist, das Gel ohne Zerstörung zu schmelzen. Gele mit HM-Pektin werden dementsprechend oft als "thermosirreversibel" bezeichnet. Die Verteilung von freien Carboxygruppen und methylveresterten Carboxygruppen entlang der Molekülkette ist für die Funktionalität von Bedeutung. HM-Pektin mit blockartiger Methylesterverteilung geliert bei höherer Temperatur als Pektin mit gleichem (mittlerem) Methylestergehalt bei einer gleichmäßigeren Verteilung.^[9] Die Gelierung von Pektin mit niedrigem Methylierungsgrad (LM) mit DM < 50% wird durch Absenken der Temperatur in Gegenwart von Ca-Ionen induziert. Sie wird durch Komplexbildung von Abschnitten zweier unterschiedlicher Pektinketten mit den Ionen ausgelöst.^[114,121–123] Zudem kann LM-Pektin auch in Abwesenheit von Ca-Ionen gelieren, indem der pH-Wert unter etwa 3,3 abgesenkt wird, was eindeutig mit der fortschreitenden

Verringerung der Ladungsdichte von Pektin bei abnehmendem pH-Wert ab $< 4,5$ zusammenhängt.^[68]

2.3 Chemische Modifizierungen von Pektin

Wichtige Untersuchungen zur Chemie des Pektins wurden größtenteils in den 1950er Jahren und dann erst wieder in den 1990er Jahren durchgeführt, was in unterschiedlichen Reviews zusammengefasst worden ist. In den letzten Jahren tauchte das Themengebiet zur chemischen Modifizierung von Pektin vereinzelt wieder in der Fachliteratur auf. Die Umsetzungen, hauptsächlich Veresterungen und Veretherungen, zielen dabei meist darauf ab, Nanostrukturen mit Hilfe von Pektinderivaten zu erzeugen.^[124] Weiter lassen sich Ansätze finden, wonach modifizierte Pektine in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie als Emulgatoren oder Wasserrückhaltemittel eingesetzt werden können.^[81] Generell hat das Interesse an dem Polysaccharid Pektin wieder zugenommen. Die am Grundgerüst vorhandenen Hydroxy- und Carboxygruppen bieten eine Vielzahl an Möglichkeiten für die chemische Umsetzung. Die dabei entstehenden Derivate können durch Variation der Syntheseparameter gezielt in deren Eigenschaften verändert werden. In dem folgenden Abschnitt soll eine aktuelle Übersicht zu den verschiedenen Methoden der Modifizierung von Pektin gegeben werden. Der Fokus liegt hier auf der Substitution (Alkylierung, speziell Veretherung oder auch Quaternisierung, Amidierung, Sulfatierung, Silylierung, usw.), Acetalbildung, Veresterung speziell Thiolierung mit einer α -Thiocarbonsäure, Oxidation, Salz- und Schiff'sche Basenbildung. Die Eigenschaften und mögliche Anwendungen einiger Pektinderivate werden ebenfalls im folgenden Abschnitt vorgestellt.^[124]

Bevor die chemische Modifizierung von Pektin betrachtet wird, muss erwähnt werden, dass sich die chemische Stabilität von Pektinen in wässrigen Systemen signifikant von anderen Polysacchariden, wie Cellulosederivaten oder Stärke, unterscheidet. Die größte Stabilität weist Pektin in wässriger Lösung bei einem pH-Bereich von 3 - 4 auf. Oberhalb dieses pH-Bereiches kann Depolymerisation einsetzen, welche durch β -Eliminierung das Pektin spaltet. Die β -Eliminierung erfolgt naturgemäß an den glykosidischen Bindungen, an dem C4 von Methylestern der Anhydrogalacturonsäure-Einheiten (AGE) (Abbildung 16).

Dementsprechend ist HM-Pektin besonders anfällig für diese Art des Polymerabbaus. Eine Temperaturerhöhung begünstigt den Polymerabbau.^[125,126]

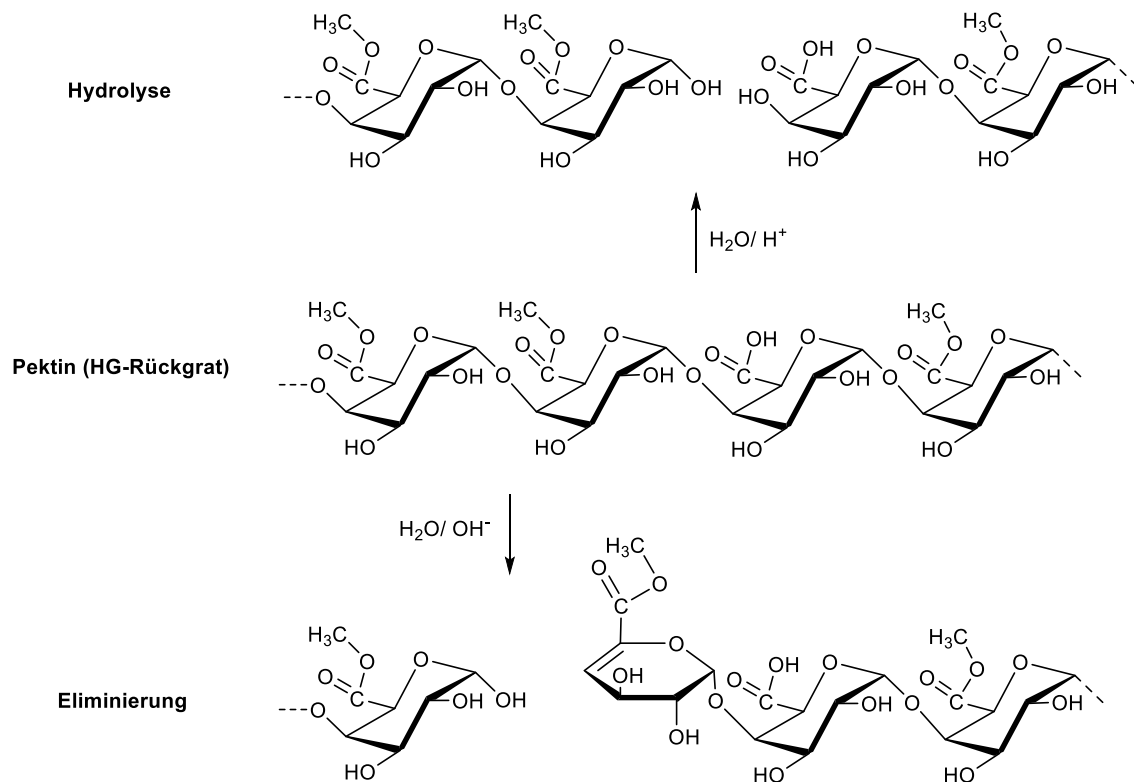


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Kettenabbaus am Pektinrückgrat, im Sauren durch Hydrolyse (oben) und im Alkalischen durch Eliminierung (unten).

Aufgrund dieses Abbaus haben Pektinlösungen mit pH-Werten über 7 nur eine temporäre Beständigkeit. Der Zerfall erfolgt sogar in Gegenwart von verdünnten Basen. LM-Pektin ist robuster gegenüber pH-Wert-Erhöhungen, sollte trotzdem nicht bei hohen Temperaturen und einem pH-Wert über 5 gehandhabt werden. Bei niedrigem pH-Wert wird eine Depolymerisation des Rückgrates und die Esterspaltung durch Hydrolyse verursacht.^[125]

Es gibt eine Vielzahl von Synthesewegen für die Modifizierung der Carboxygruppe. Dazu zählt zum einen die Verwendung von Diazomethan, welche *Deuel et al.* 1950 anwandten und noch 1995 von *Klavons und Bennett* verwendet wurde.^[127,128] Laut *Jansen und Jang*, 1946, lässt sich Pektin auch in HCl-saurem Methanol verestern.^[129] Zudem ist dies das am häufigsten verwendete Verfahren zur Veresterung der Carboxygruppe von Pektin.^[130] Bei diesem Verfahren wird Pektin mit katalytischen Mengen Schwefelsäure oder Salzsäure direkt mit einem Überschuss an Methanol verestert. Die Reaktionstemperatur sollte bei 5 °C liegen, um den Abbau durch Spaltung der glykosidischen Bindungen zu minimieren. Beide Varianten werden heterogen durchgeführt. *Matricardi et al.* zeigten 1995, dass die Umsetzung von

Pektin zum Tetrabutylammoniumpektinat (TBA-Pektinat) zur Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, wie DMSO, führt. Dies ermöglicht eine homogene Reaktionsführung, wodurch eine Substitution der Carboxygruppe durch Dihalogenkane oder Dihalogenaromaten ohne Kettenabbau möglich ist.^[131] Andere Autoren berichteten jedoch, dass es ohne umfassende Depolymerisation nicht möglich ist, einen hohen DM zu erreichen.^[132] Die bisher effizienteste Methode mit nur geringem Abbau wurde von *Rosenbohm* 2003 beschrieben. Dabei kam es zur quantitativen Umsetzung (DM von 1,0) bei der Verwendung von wasserfreiem Methanol, das mit Acetylchlorid bei 5 °C angesäuert wurde.^[132]

Bei der Esterspaltung kommt es zur Umwandlung in die Carbonsäure am C6. Die Esterspaltung ist eine wichtige und häufig verwendete Reaktion zur Veränderung der Eigenschaften von Pektin, die bei physiologischen Prozessen während der Pflanzenentwicklung, oder bei physikalisch-chemischen Behandlungen auftritt. Auf industrieller Ebene ist diese Reaktion sehr bedeutsam. LM-Pektine erhält man dabei üblicherweise durch kontrollierte Esterspaltung im sauren Medium, (*El-Nawawi und Heikal*), im Alkalischen (*Renard und Thibault*) oder durch den Einsatz von Pektinmethylesterasen (PME) (*Kim et al.*) (Abbildung 16).^[133–135] Sowohl die saure (Hydrolyse) als auch die basische (Eliminierung) Esterspaltung müssen bei niedrigen Temperaturen durchgeführt werden, um den Abbau des Polymerrückgrates möglichst gering zu halten. Die Verteilung der nach der Esterspaltung im Rückgrat verbleibenden Estergruppen kann statistisch oder blockweise sein und die Eigenschaften der gebildeten Pektine, besonders die ionische Gelbildung, in hohem Maße beeinflussen.^[130,136] Die Verteilung der verbleibenden Estergruppen nach der Verseifung untersuchten *Hunter und Wicker* 2005 und wiesen eine statistische Verteilung nach.^[137] Bei der enzymatisch katalysierten Esterspaltung hängt die resultierende Verteilung der am Pektinrückgrat verbleibenden Methylestergruppen von der Herkunft des eingesetzten Enzyms ab. Aus Pilzen gewonnene PME führen hauptsächlich zu einer statistischen Verteilung der im Makromolekül verbleibenden Methylestergruppen. Im Gegensatz dazu führen PME aus Pflanzen zu einer blockweisen Verteilung der verbleibenden Methylester.^[43] Diese Selektivität der unterschiedlichen PMEs hat eine besonders hohe Bedeutung für die Strukturaufklärung der Pektine gewonnen.^[25,138,139] Studien über den gezielten Einsatz von Enzymen in der Pektinchemie sind umfassend in einem Review von *Duvetter et al.*, 2009 diskutiert worden.^[140]

2 Allgemeiner Teil

Um die Hydrophobie von Pektin zu erhöhen, kann dieses mit langkettigen Alkylhalogeniden alkyliert werden. Dafür wird beispielsweise das TBA-Pektinat mit dem entsprechenden Alkylhalogenid umgesetzt, ähnlich wie bei der Methylierung (Abbildung 17).

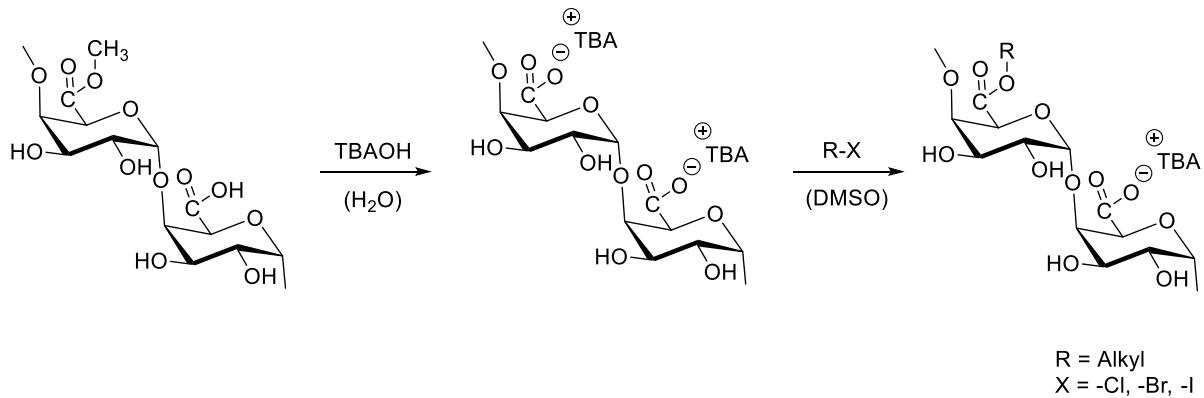


Abbildung 17: Bildung der Tetrabutylammoniumsalzform von Pektin mit anschließender Alkylierung der Carboxylatgruppe durch Alkylhalogenide.

Bei der Umsetzung von TBA-Pektinat mit einem C₁₂-Alkylbromid in DMSO konnte *Miralles-Houzelle et al.*, 2001 den entsprechenden C₁₂-Pektin-Ester synthetisieren.^[141] Die erhaltenen Derivate zeigen ein deutlich hydrophoberes Verhalten. Auch 2014 wurde diese Variante der Derivatisierung von TBA-Pektin mit Alkylbromid noch einmal von *Liang et al.* aufgegriffen und Pektine mit Alkylketten unterschiedlicher Länge (Hexyl, Dodecyl oder Octadecyl) mit unterschiedlichen DS synthetisiert und die Produkte insbesondere bezüglich der rheologischen Eigenschaften untersucht.^[142] Eine weitere Methode, Pektin oder PGaIS zu alkylieren, ist die Umsetzung mit Diazoalkanen, Triethylorthoacetat oder Alkanol/p-Toluolsulfonsäure nach *Klavons und Bennett*, 1995.^[128] Darüber hinaus ist die Durchführung der Diazoalkan-Methode äußerst kritisch zu bewerten, da Diazomethan giftig, explosiv und leicht flüchtig ist.

Die Veresterung bietet auch vielfache Möglichkeiten, die Eigenschaften von Pektin zu verändern. Dabei ist die Acetylierung eine der wichtigsten Reaktionen an den Hydroxygruppen des Pektins. Aus einigen Pflanzen gewonnene Pektine, beispielsweise aus Zuckerrüben, Kartoffeln und Sonnenblumen, können von Natur aus am C2 und / oder C3 von der AGE acetyliert sein (Abbildung 3).^[143–145] Die Acetylierung sowie Formylierung von Pektinderivaten ist eine Umsetzung, die schon 1936 von *Schneider und Ziervogel* durchgeführt wurde.^[146] Als Ausgangsstoff für die Umsetzung diente hier Nitropektin (Pektinnitrat), welches durch Nitrierung von Pektin mit konzentrierter Salpetersäure hergestellt wurde. Der Vorteil dieses Derivates ist seine veränderte Löslichkeit gegenüber

reinem Pektin. Beispielsweise ist Nitropektin löslich in Essigsäureanhydrid, welches direkt als Acylierungsmittel für dieses Material eingesetzt werden kann. Die Charakterisierung der veresterten Derivate erfolgte durch Elementaranalyse. So konnten Produkte mit einem Estergehalt von bis zu $D_{Ac} \sim 0,7$ Essigsäure bzw. $DS \sim 0,2$ Ameisensäure detektiert werden (Tabelle 1). Eine Umrechnung in die heutzutage üblichen DS-Werte ist mit den publizierten Daten jedoch nicht möglich, erlaubt also keine direkte Vergleichbarkeit mit neueren Ergebnissen. Knapp zehn Jahre später, 1946, wurde von *Carson und Maclay* die Umsetzung mit Säureanhydriden und Pyridin publiziert, womit Anteile von $DS \sim 0,7$ Acetat bis hin zu $DS \sim 0,8$ Butyrat erzielt werden konnten.^[147] Diese Methode war für andere Polysaccharide zu jenem Zeitpunkt bereits bekannt, wie für Cellulose durch *Staudinger und Daumiller* sowie für Stärke durch *Staudinger und Husemann*, 1937.^[148,149] Ein weitaus höherer Veresterungsgrad von $DS \sim 1,5$ mit Essigsäure wurde von *Solms und Deuel* 1951 beschrieben.^[150] Die Detektion der Acetylgruppen erfolgte lediglich mit befriedigenden Ergebnissen nach der Methode von *Freudenberg*. Dabei wurde in wasserfreiem Milieu mit alkoholischer *p*-Toluolsulfosäure der Essigsäuremethylester abgespalten, anschließend der leichtflüchtige Ester abdestilliert, verseift und bestimmt.^[151] Mit unterschiedlichen Veresterungsgraden gehen auch Veränderungen in den Eigenschaften einher. Durch einen erhöhten Veresterungsgrad der Hydroxygruppen wird die Koagulationsfähigkeit mit bivalenten Metallionen eingeschränkt, zudem ist eine Viskositätszunahme in wässriger Lösung zu verzeichnen. Eine Vielzahl von Forschern beschäftigte sich mit dem Thema und sie stellten fest, dass Acetylgruppen einen ähnlich großen Einfluss auf die Polysaccharideigenschaften besitzen wie die Methylestergruppen.^[67,88,152,153]

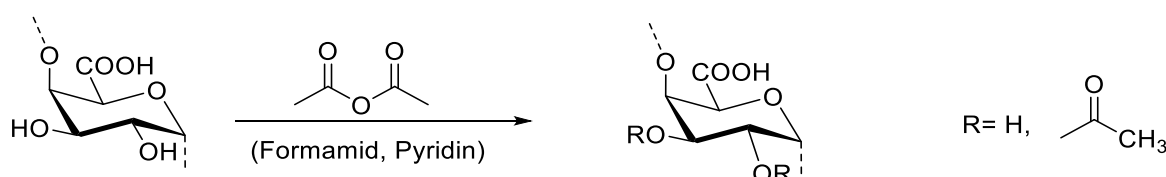


Abbildung 18: Pyridin katalysierte Acetylierung von Pektin mit Essigsäureanhydrid in Formamid.

Zum Einfluss der Acetylgruppen auf die ionische Gelbildung zeigten *Pippen et al.*, 1950, dass Zitruspektin ab einem $D_{Ac} > 0,2$ zu einer Einschränkung der Gelbildung führt. Ab einem $D_{Ac} > 0,2$ findet keine ionotrope Gelbildung mehr statt.^[154] Im Jahr 1951 erhielten *Solms und Deue* hoch acetyliertes Pektin mit einem $D_{Ac} \sim 1,5$.^[150] *Schweiger* erreichte 1964 einen D_{Ac} von $\sim 1,7$ (Tabelle 1).^[155] Bei Viskositätsuntersuchungen der acetylierten Pektine konnte gezeigt werden, dass ein steigender D_{Ac} für eine Viskositätszunahme verantwortlich sein

kann. Nach *Schweiger* tritt dabei ein Plateau der Viskosität bei einem D_{Ac} von 1,0 auf. Weiter führt die Veränderung des Polysaccharidrückgrates durch Acylierungen dazu, dass ein enzymatischer Abbau des Pektins stark gehemmt wird. ^[156,157]

Eine Acetylierung der *D*-Galacturonsäureeinheiten verringert die Bindungsstabilität von Calcium mit Pektin und verhindert eine Gelierung bereits dann, wenn eine von acht *D*-Galacturonsäureeinheiten an O2 oder O3 acetyliert vorliegt. ^[158–160] Dies wurde auf eine sterische Wechselwirkung zurückgeführt. Die Anwesenheit von Acetylgruppen behindert den Zutritt von Calciumionen in die unmittelbare Nähe zweier benachbarter Carboxygruppen, sodass zur Gelbildung führende Wechselwirkungen unterbunden werden. *Renard und Jarvis* zeigten 1999, dass die Acetylierung Veränderungen der Konformation- und Komplexierungseigenschaften hervorruft. ^[105] Die Acetylierungsprodukte von Pektin können als Stabilisator und Emulgator eingesetzt werden, dies untersuchten *Leroux et al.* in 2003. ^[14] Die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid wurde in verschiedenen Lösungsmittel-Katalysator-Systemen untersucht. Für die Umsetzungen wurden Pyridin oder *N*-Methylimidazol als Hilfsbasen in DMSO oder Formamid eingesetzt. *Renard und Jarvis* berichteten, dass die besten Ergebnisse mit einem $D_{Ac} > 1,5$ bei der Verwendung von Pyridin in Formamid mit einem Überschuss an Essigsäureanhydrid erzielt wurden. ^[161] Die Acetylierung fand somit an beiden Hydroxygruppen (C2 und C3) statt, mit leichter Präferenz zur C2-Gruppe der AGE. ^[161]

Tabelle 1: Übersicht Acetylierung von Pektin bzw. Pektinderivaten seit 1936.

Jahr	Autor	DS	Reagenz
1936	<i>G. Schneider und M. Ziervogel</i>	~ 0,7*	Essigsäureanhydrid
1946	<i>J. F. Carson und W. D. Maclay</i>	~ 0,6*	Essigsäureanhydrid
1951	<i>J. Solm und H. Deuel</i>	1,5	Essigsäureanhydrid
1964	<i>R. G. Schweiger</i>	1,7	Essigsäureanhydrid
1999	<i>C.M.G.C. Renard und M.C. Jarvis</i>	>1,5	Essigsäureanhydrid

* Werte wurden für eine bessere Vergleichbarkeit aus prozentualen Angaben in den DS umgerechnet

Die Verteilung der Acetylgruppen, entlang der Kette, kann durch eine heterogene oder homogene Reaktionsführung beeinflusst werden. Die Acetylierung von TBA-PGal, gelöst in DMSO, führte zu einer homogenen Verteilung der Acetylgruppen nach *Renard und Jarvis*, während Studien von *Rexova-Benkova et al.*, 1977 zeigten, dass bei heterogener Reaktionsführung Diacetylderivate bevorzugt entstehen. ^[156,161]

2 Allgemeiner Teil

Um Pektin für ein breiteres Anwendungsfeld verfügbar zu machen, wurden neben dem Essigsäureanhydrid auch längerkettige Fettsäureanhydride für die Veresterung der Hydroxygruppe des Pektins verwendet. *Monfregola et al.* führten die Veresterung der Pektin-OH-Gruppen mit Palmitinsäure-, Ölsäure- und Linolsäureanhydrid durch.^[162] Alle Veresterungsreaktionen wurden durch mechanisches Mahlen des Pektins mit den entsprechenden Fettsäureanhydriden in Gegenwart einer katalytischen Menge Kaliumcarbonat (K_2CO_3) unter lösungsmittelfreien Bedingungen durchgeführt (Abbildung 19). Dieser lösungsmittelfreie Prozess wird als effizient und umweltfreundlich beschrieben. Da die Reaktion jedoch bei 160 °C durchgeführt werden muss und die Produkte durch Extraktion mit Chloroform gereinigt werden, sind diese Aussagen zweifelhaft. Die durch diese Veresterung erhaltenen Produkte weisen eine wesentlich geringere Wassersorption auf als natives Pektin.

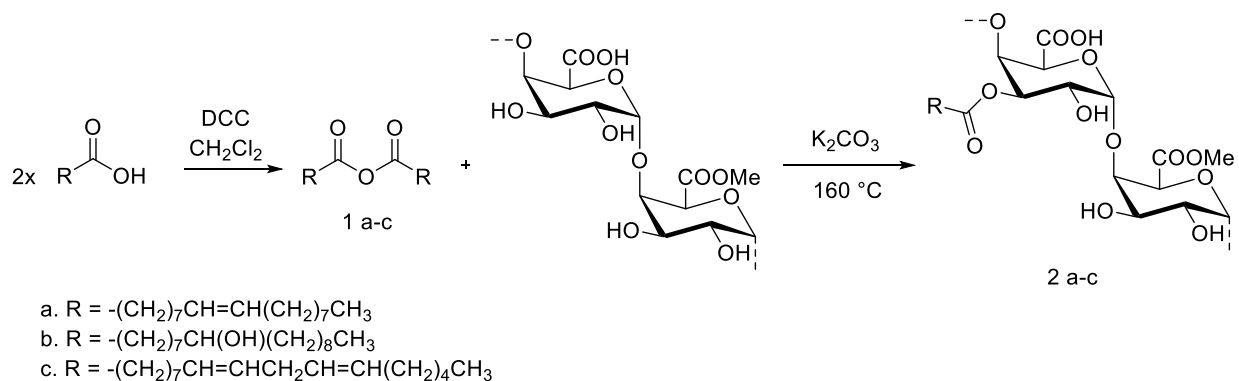


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Veresterung der Pektin-OH-Gruppen mit Palmitinsäure-, Ölsäure- oder Linolsäureanhydrid durch mechanisches Mahlen, katalysiert durch Kaliumcarbonat.

Eine weitere Reaktion, welche auch im industriellen Maßstab Anwendung findet, ist die Amidbildung. Die erhaltenen Derivate finden großen Zuspruch in der Lebensmittelindustrie, da sie eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Ca-Ionen und pH-Wert-Schwankungen aufweisen. Das übliche Vorgehen zur Herstellung von amidiertem Pektin ist die Umsetzung von HM-Pektin mit Ammoniak in wasserfreiem Methanol (Abbildung 20). Bei dieser Reaktionsführung kommt es sowohl zu einer Verseifung als auch zur Substitution der Estergruppen in das entsprechende Amid.^[163]

Eine weitere Möglichkeit zeigten *Rha et al.*, 2011, durch die Umsetzung von HM-Pektin mit Hydroxylamin. Dabei reagiert die Carboxygruppe zu Hydroxamsäure und es werden Amidgruppen mit der allgemeinen Struktur $CO-NHR$ erzeugt.^[164]

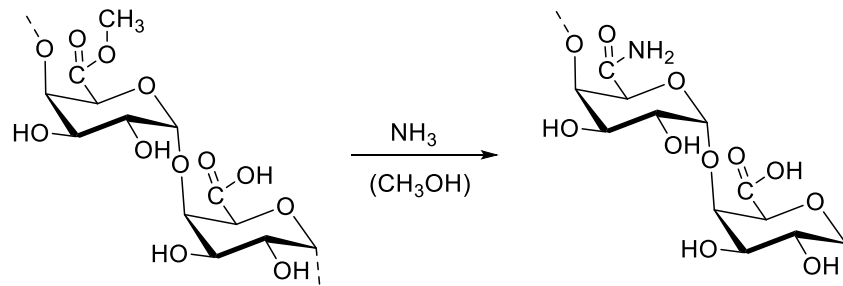


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Amidbildung von Pektin mit Ammoniak in Methanol.

Bei Untersuchungen wurde festgestellt, dass die synthetisierten Hydroxamsäurederivate eine erhöhte Aktivität als Radikalfänger besitzen. Aus den Studien resultierte eine dreimal höhere Aktivität als zum vergleichbaren nativen Pektin. *Sinitsya et al.* zeigten 2000, dass sich bei der Umsetzung von primären Aminen mit HM-Pektin in Methanol sekundäre Amidgruppen bilden. Dieses Verfahren kann verwendet werden, um eine Vielzahl von unterschiedlich substituierten Amiden des Pektins zu erhalten.^[165] Eine weitere Möglichkeit, Amide des Pektins zu erzeugen, ist die Umsetzung in Gegenwart von Wasser und Proteasen unter Verwendung von Aminen oder Aminosäuren nach *Cheng et al.*, 2000.^[166]

Amidierte Pektine sind in wässriger Lösung thermoreversibel. Dies ist eine vorteilhafte Eigenschaft für die Lebensmittelanwendung, d.h. es kann gelieren, geschmolzen und wieder in ein Gel überführt werden. Zudem können Amide des Pektins aufgrund ihrer hervorragenden Gelieeigenschaften durch ionische Gelbildung zu Hydrogelen verarbeitet werden, die sich für die Abgabe von spezifischen Arzneimitteln, wie Indomethacin und Sulfamethoxazol, oder zum Einschluss von Insulin eignen.^[167–169] Am Pektinrückgrat gebundene funktionelle Gruppen beeinflussen die physikalischen und chemischen Eigenschaften von amidierten Pektinderivaten und deren mögliche Anwendung noch zusätzlich. Beispielsweise ist das amidierte Pektin mit aliphatischen oder aromatischen Gruppen hydrophober als natives Pektin.^[165]

Synytsya et al., 2004, synthetisierten N-Octadecylpektinamid, welches als hydrophobes Sorbens oder Tensid eingesetzt werden kann.^[170]

Wohingegen *Zouambia et al.*, 2009 zeigten, dass Pektinoctylamid, Pektindodecylamid und Pektinooctadecylamid sich als gute Emulgatoren oder zur Partikelstabilisierung eignen.^[171]

Kurita et al. untersuchten 2012 die Umsetzung von Pektin mit Glycinmethylester in Wasser und die sich daraus bildenden Amide.^[172] Die erhaltenen Derivate zeigten eine signifikant bessere Wasserlöslichkeit.

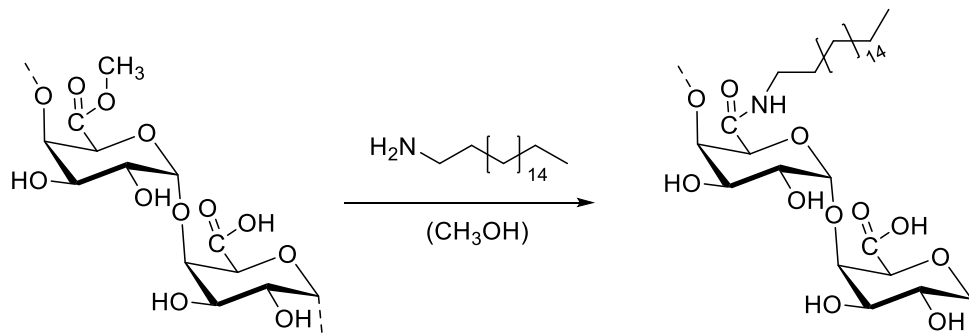


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Amidbildung von Pektin mit N-Octadecylpektinamid in Methanol, heterogen.

Um die Eigenschaften von Pektin weiter gezielt zu verändern, beschrieben *Geresh et al.*, 2000 die Überführung von Pektin in ein kationisches Derivat durch die Einführung eines Ethers mit einer quarternären Ammoniumfunktion.^[173] Ein Beispiel dafür ist die basisch katalysierte Umsetzung von Pektin mit 3-Chlor-2-hydroxypropyltrimethylammoniumchlorid (CHPTAC), was von *Fan et al.*, 2012 detailliert untersucht wurde (Abbildung 22).^[174] Die resultierenden Produkte erreichen einen DS > 2, wobei es sowohl zur Umsetzung der Carboxy- als auch Hydroxygruppen kommt. Damit einhergehende Eigenschaften sind ein verbessertes Feuchtigkeitsabsorptions- und Feuchtigkeitsrückhaltevermögen. Teilweise übertreffen sie dabei Hyaluronsäure bezüglich Feuchtigkeitsrückhaltevermögen, die als Referenzmaterial eingesetzt wurde. Ferner zeigen die synthetisierten Derivate antimikrobielle Wirkung.

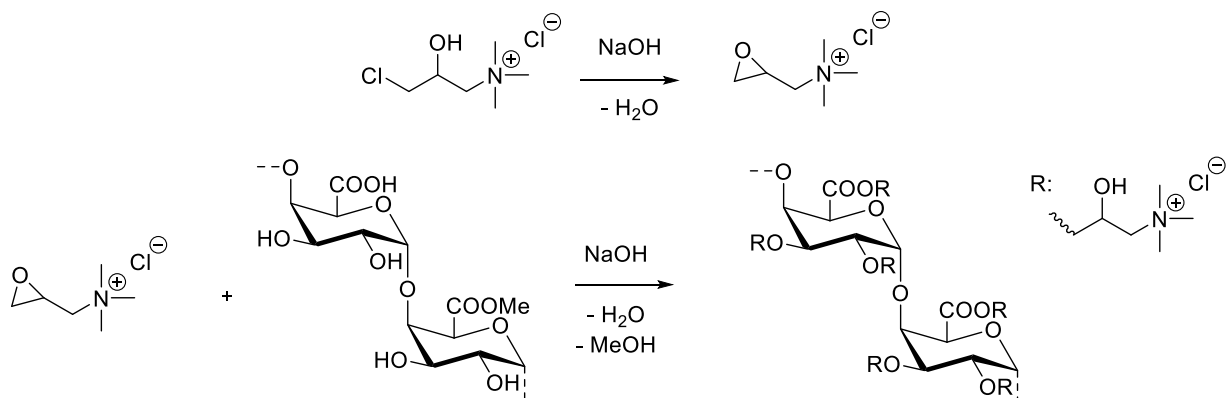


Abbildung 22: Umsetzung von Pektin mit 3-Chlor-2-hydroxypropyltrimethylammoniumchlorid (CHPTAC) in Wasser, basisch katalysiert.^[174]

Amidierte Pektine, welche weiter mit CHPTAC umgesetzt werden, können zudem als effizienter DNA-Träger für die Abgabe von Genen an Krebszellen genutzt werden.^[175]

Simkovic et al. modifizierten 2009 Pektin mit Trimethylammonium-2-hydroxypropyl- (TMAHP) oder 2-hydroxypropylsulfonat (HPS)-Gruppen direkt bei der Extraktion des Pektins

aus Zuckerrüben.^[176] Durch die direkte Umsetzung wird während des Extraktionsverfahrens simultan mehr Material gelöst und quartärer Stickstoff angehängen. In einem Folgeversuch von *Simkovic et al.*, 2010 wurde die Extraktion und simultane Quarternisierung mit Glycidyltrimethylammoniumchlorid im sauren Milieu durchgeführt, was die Extraktionsausbeute erhöhte.^[177]

Aufgrund des großen Interesses an der Entwicklung von mukoadhäsiv wirkenden Substanzen der „zweiten Generation“ hat die Forschung zur Einführung von Thiolgruppen in Pektin stark zugenommen. Natürliche Polysaccharide gehören zur „ersten Generation“ der mukoadhäsiven Polymere, die nichtkovalent mit der Schleimschicht wechselwirken können, beschrieben im Review von *Smart et al.*, 2005.^[124,178] Die mukoadhäsiven Eigenschaften natürlicher Polymere können durch Thiolgruppen verbessert werden. Die Thiole sind in der Lage, Disulfidbindungen mit den cysteinreichen Subdomänen der Schleimschicht auf der Schleimhaut einzugehen; dies wies *Bernkop-Schnürch* im Jahr 2005 nach.^[179] 2008 sulfonierten *Simkovic et al.* Pektin mit 3-Chlor-2-hydroxy-1-propansulfonat, dieser Reaktionsweg zeigte sich aber als nicht effizient, da die Reaktion mit großem Überschuss an 3-Chlor-2-hydroxy-1-propansulfonat und bei erhöhtem Druck durchgeführt werden muss.^[180] *Sharma und Ahuja* synthetisierten 2011 ein thioliertes Pektin durch Veresterung von Pektin mit Thioglykolsäure unter sauren Bedingungen (Abbildung 23).^[181] Das resultierende thiolierte Pektin zeigte eine verbesserte mucoadhäsive Eigenschaft. Zudem war es möglich aus den Derivaten Nanopartikel mit Timololmaleat als Modellwirkstoff zu synthetisieren. Dazu wurde Magnesiumchlorid als Vernetzer verwendet. Die Untersuchungen der resultierenden Nanopartikel zeigten eine Ex vivo-Hornhautpermeation von Timololmaleat, was darauf hinweist, dass thioliertes Pektin ein vielversprechendes mukoadhäsives Polymer für die okulare Abgabe von Timololmaleat ist.^[182]

Majzoob et al. erforschten 2006 die Aktivierung von Pektin mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDAC) und anschließender Umsetzung mit Cystein, wobei es zu einer Ausbildung von Amidbindungen zwischen den primären Aminogruppen des Cysteins und den Carboxygruppen des Pektins kommt (Abbildung 24a).

2 Allgemeiner Teil

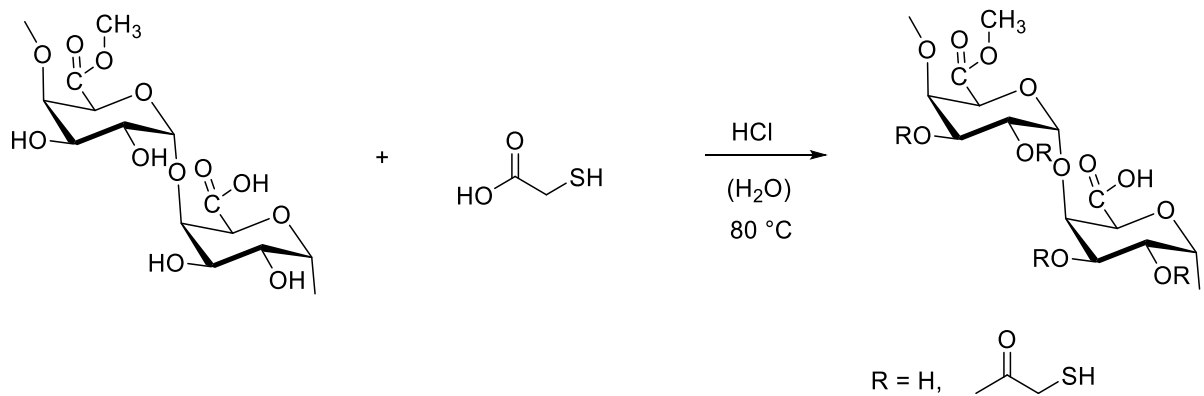


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Thiolierung von Pektin durch die Veresterung mit α -Mercaptoessigsäure, katalysiert durch Salzsäure.

Das resultierende Produkt hatte eine verbesserte biologische Abbaubarkeit, eine verlängerte In-vitro-Adhäsionsdauer, verbesserte Kohäsionseigenschaften und keine schwerwiegende Toxizität in Caco-2-Zellen.^[183]

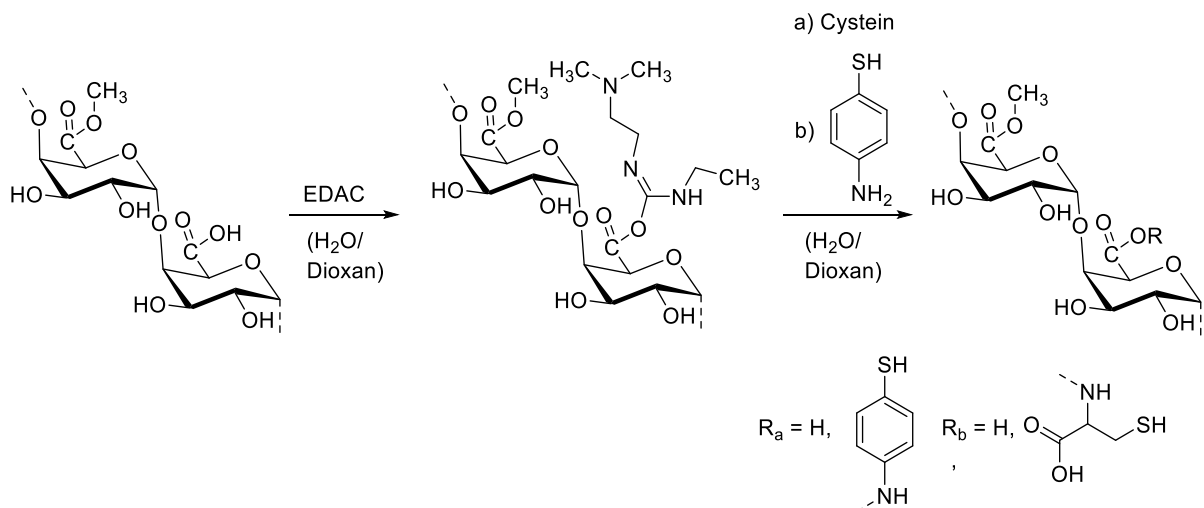


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Thiolierung von Pektin in Wasser / Dioxan mit a) 4-Aminothiophenol und b) Cystein nach der Aktivierung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDAC)

Perera et al. knüpften 2010 an die Aktivierung von Pektin mit EDAC an und beschrieben die Umsetzung mit 4-Aminothiophenol (Abbildung 24b). Die daraus entstehenden Produkte können durch Oxidation der Thiolgruppen zu Disulfidbindungen vernetzt werden.^[184,185] Eine Sulfatierung von Pektin ist ebenfalls bereits beschrieben worden. Es ist bekannt, dass Sulfatgruppen an Polysacchariden einen starken physiologischen Effekt zeigen, dazu zählen z.B. antikoagulative, antithrombische, kontrazeptive, antioxidative, antiphlogistische, antikarzinogene oder auch antimikrobielle Wirkung.^[186,187] Maas et al. und Fan et al. zeigten 2012, dass verbesserte antimikrobielle, gerinnungshemmende und antithrombotische Wirkungen bei sulfatierten Pektinen vorhanden sind.^[188,189] Möglichkeiten für die

2 Allgemeiner Teil

Sulfatierung von Pektin sind die Umsetzung mit Schwefelsäure, Chlorsulfonsäure, Monomethylsulfat, Sulfotrioxid, Sulfurylchlorid oder Sulfaminsäure in Gegenwart von Formamid, DMSO, Trimethylamin oder Pyridin. *Vityazev et al.*, 2010 verglichen die Sulfatierungsreagenzien Chlorsulfonsäure, Pyridinsulfotrioxid und Pyridinmonomethylsulfat. Dabei zeigte sich Chlorsulfonsäure durch den höchsten DS, geringsten Polymerabbau und die größere Ausbeute am geeignetsten.^[190] In einer weiteren Studie wurde ein neues Sulfatierungsmittel mit Pektin zur Reaktion gebracht. 2012 konnten *Fan et al.* mittels trisulfoiertem Natriumamin $[N(SO_3Na)_3]$ sulfatiertes Pektin in einer einfachen und effizienten Methode synthetisieren.^[189] Sulfatierte Pektine zeigen antikoagulative und antithrombotische Wirkung. *Vityazev et al.* untersuchten 2010 die Antikoagulationseigenschaften in Abhängigkeit von Substitutionsmuster, Pektinquelle, DS und dem Molekulargewicht genauer, welches Anwendungsfelder in der Medizintechnik ermöglichte.^[190,191]

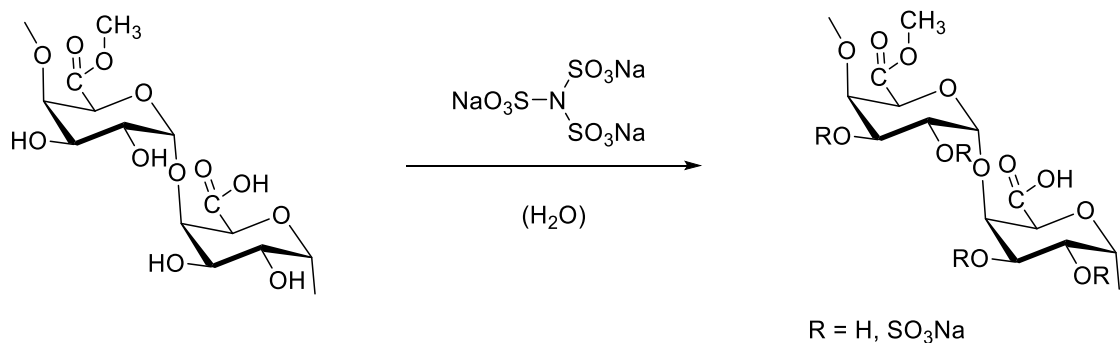


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Sulfatierung von Pektin mit trisulfoiertem Natriumamin $[N(SO_3Na)_3]$.

Vermehrte Aufmerksamkeit wurde in den letzten Jahren auf die Oxidation von Pektin gelegt, wodurch andere funktionelle Gruppen am Pektin zur Verfügung gestellt werden. Zusätzlich bauen sich oxidierte Pektine im menschlichen Organismus schneller ab, was deren Anwendung im Bereich der Wirkstofffreisetzung bevorzugt.^[192] Es wurden verschiedene Oxidationsmittel eingesetzt, wie Natriumperodat, Natriummetavanadat, Cr^{VI} , Cr^V und Cr^{IV} . Bei der Verwendung von Natriummetavanadat ($NaVO_3$) zeigten *Gessa et al.*, 1983, dass die terminalen Einheiten des Pektins selektiv oxidiert werden. Die Oxidation mit Natriumperodat ist eine etablierte Methode und wurde von *Abdel-Hamid et al.* 2003 untersucht. Bei der Oxidation mit Natriumperodat kommt es an der 2- und 3-Position zur Spaltung der Pyranose und es entstehen zwei Aldehydgruppen in jeder oxidierten AGE (Abbildung 26).^[193,194] Zu beachten ist, dass es bei der Periodatoxidation zu einem relativ

2 Allgemeiner Teil

starken Abbau des Polymers kommt, bedingt durch die Spaltung der glycosidischen Bindungen. Die bei der Periodatoxidation entstehenden Aldehydgruppen können sowohl zur Immobilisierung von Wirkstoffen, als auch zur Bildung von Hydrogelen mit Vernetzern eingesetzt werden.

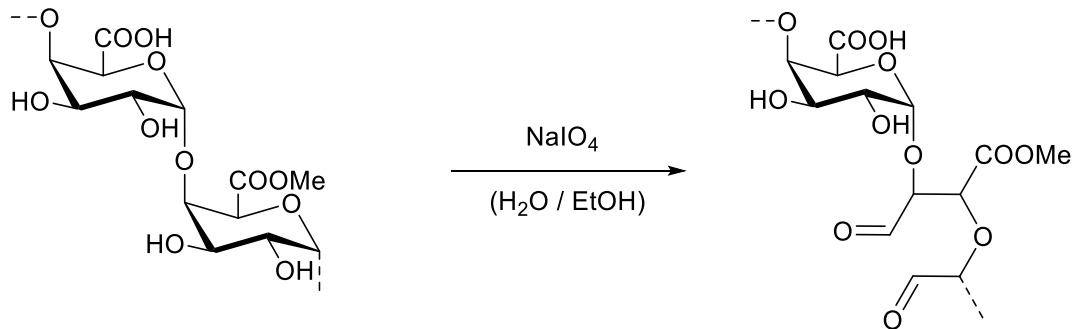


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Oxidation von Pektin mit Natriumperiodat in einem Wasser / Ethanol-Gemisch.

Wohingegen *Bellú et al.* 2008 zeigten, dass Cr^{VI} , Cr^{V} und Cr^{IV} selektiv die Carboxygruppen der AGE durch einen CC-Bindungsbruch und Freiwerden von Kohlenstoffdioxid oxidieren.^[195] Die Wahl des Oxidationsmittels hat zudem einen signifikanten Einfluss auf das entstehende Oxidationsmuster.

Durch die Derivatisierung von Pektin mit Silylreagenzien sollten hydrophobe aber noch gelbildende Produkte erzeugt werden. Silylderivate werden in der organischen Chemie auch als Schutzgruppen eingesetzt, z.B. zur Blockierung von Nukleophilen wie OH^- , NH_2^- oder SH^- Einheiten.^[196] In der Polysaccharid (PS)-Chemie ist ein weiterer Effekt von Interesse, denn silylierte PS besitzen meist eine verbesserte Löslichkeit im Vergleich zu den Ausgangsmaterialien. Die Löslichkeitsänderung wurde im Detail mit Cellulose untersucht, z.B. durch Umwandlung in die Trimethylsilylcellulose (TMSC).^[197] Im Gegensatz zu Cellulose, die sich nur in ionischen Flüssigkeiten oder dipolaren aprotischen Lösungsmitteln unter Zusatz von Salzen löst, sind die TMSC-Proben je nach DS in verschiedenen organischen Lösungsmitteln löslich. So kann TMSC z.B. in Ethylacetat bei einem DS von 1,8, in Tetrahydrofuran (DS von 1,7 - 3,0) oder sogar in Hexan (DS von 2,6 - 3,0) gelöst werden.^[197–200] Zudem ist die Regenerierung von Cellulose durch Desilylierung von TMCS bekannt.^[201] Die Silylierungsreaktionen ionischer Polysaccharide wurden im Vergleich dazu nur wenig untersucht. Zur Synthese von Silylderivaten des Pektins wurden Tetrachlorsilan, Alkyl- und Arylsilanen in Kombination mit Formamid/Pyridin als Reaktionsmedium eingesetzt.^[202] Bei der Umsetzung von TMSCl in Pyridin konnten TMS-Pektine mit einem maximalen DS von 0,9

erhalten werden. Als Argumentation für diesen relativ geringen DS führten *Henglein und Scheinost* die sterische Hinderung von benachbarten Silylgruppen an.^[202] Trimethylsilylderivate von Pektin wurden auch mit Hexamethyldisilazan (HMDS) in Formamid hergestellt.^[203] Die erhaltenen DS-Werte waren im Vergleich zu den mit TMSCl erzielten höher (DS von 1,8). Allerdings werden die Eigenschaften der erhaltenen Produkte in der Literatur nicht ausreichend beschrieben um die Produkte genauer miteinander vergleichen zu können. Die Autoren zeigten keine Daten, die ihren Strukturanspruch stützen, sondern nur die IR-Signale für die in den Produkten gefundene Silylgruppe, ohne ein vollständiges IR-Spektrum der erhaltenen Produkte.

Neben der Pektinchemie wurde die heterogene Silylierung von Alginsäure untersucht, ein ionisches Polysaccharid mit einer Struktur, die eng mit Pektin verwandt ist.^[204] Je nach DS sind die erhaltenen Produkte in Formamid, Ethylenglykol und Propylenglykol löslich. Eine homogene und effiziente Silylierung von PGaIS gestaltet sich kompliziert. Zum einen aufgrund der Löslichkeit, welche sich auf Formamid beschränkt, welches zu Nebenreaktionen mit starken Elektrophilen neigt. Zum anderen können die Hydroxygruppen an den Positionen C2 und C3 auch als Nukleophil wirken und bei einer Aktivierung der Carbonsäuregruppe des Polysaccharids reagieren, was zum Vernetzen und damit zu unlöslichen Produkten führt.^[205]

Weitere Umsetzungsmöglichkeiten haben *Maier et al.* im Jahr 2008 aufgezeigt. Sie setzten LM-Pektine mit Glycidylmethacrylat um (Abbildung 27) und erhielten so ein Material mit geringerer Wasserlöslichkeit und polymerisierbaren Seitengruppen.^[206]

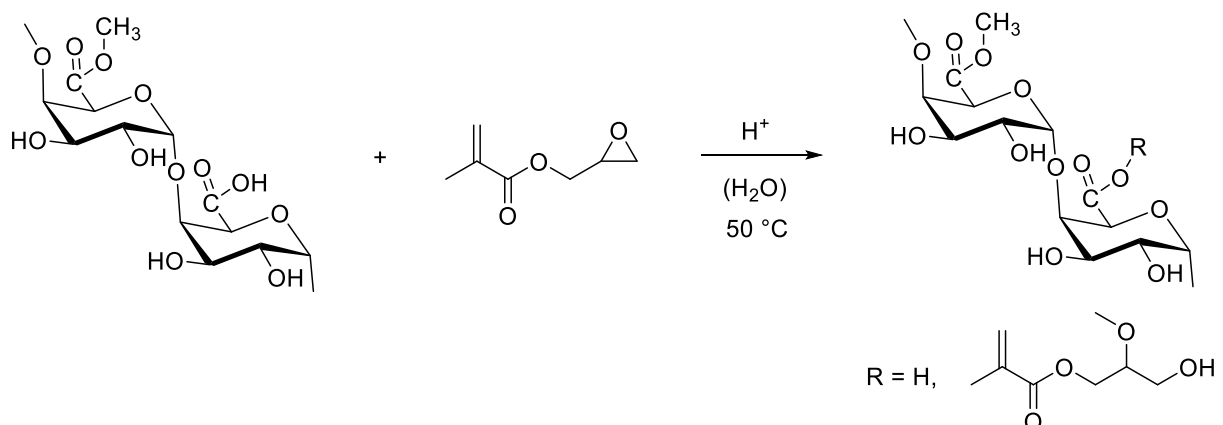


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen Pektin und Glycidylmethacrylat in Wasser, sauer katalysiert.

2 Allgemeiner Teil

Eine ähnliche Umsetzung führten *Bostanudin et al.* 2019 durch, indem Pektin mit *n*-Butylglycidylether substituiert wurde.^[207] Das erhaltene Butylglycidylpektin wurde zu Nanopartikeln umgeformt und diese ließen sich mit dem Wirkstoff Doxorubicin beladen. Daraus ergeben sich eine Vielzahl von Anwendungsperspektiven für ein Drug-release-Material basierend auf Pektinderivaten. Aber auch die UV-Markierung an der Carboxygruppe mit Benzylbromid in DMSO wurde als Derivatisierungsmöglichkeit publiziert. Die Umsetzung verläuft identisch zu der mit Alkylhalogeniden in Abbildung 17 dargestellten. Der Vorteil ist die vereinfachte Analysemöglichkeit des Aromaten durch UV-Spektroskopie zur erweiterten Aufklärung von molekularen und strukturellen Eigenschaften.^[208] Zusätzlich schreiben *Morris et al.*, 2002, dass die Hydroxygruppen von Pektin mit *p*-Carboxybenzylbromid verestert werden können. Die daraus resultierenden Produkte besitzen eine bessere Wasserlöslichkeit und sind zudem UV-aktiv.^[208]

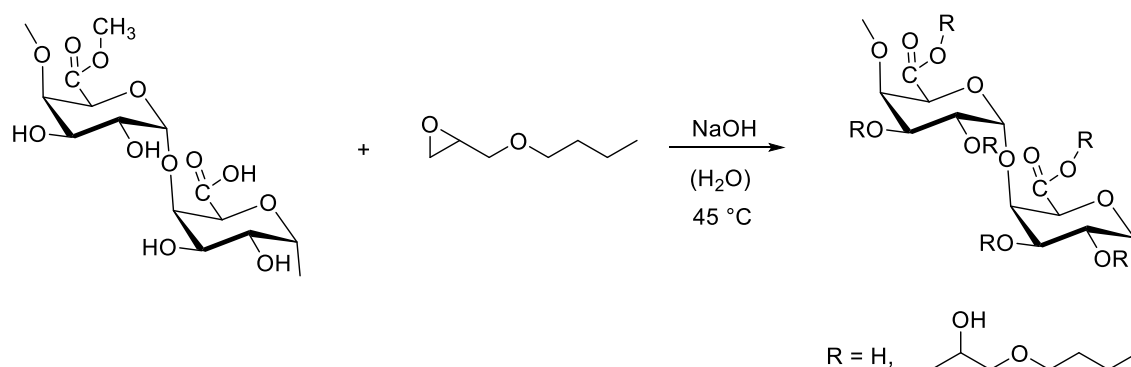


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen Pektin und *n*-Butylglycidylether in Wasser, basisch katalysiert.

Eine weitere Möglichkeit neue Pektinderivate zu synthetisieren und deren Eigenschaften zu beeinflussen ist die chemische Vernetzung. In dem vorangegangenen Abschnitt 2.2 über die Interaktionen von Pektin sind bereits einige Vernetzungsmöglichkeiten aufgezeigt worden, welche durch die natürlich am Polymer befindlichen Gruppen zustande kommen könnten. Dazu zählen die von *Matoh und Kobayashi* 1998 beschriebene Borat-Diolester-Vernetzung von RG II und die von *Vincken et al.* 2003 untersuchte Uronylester-Vernetzung zwischen HG und anderen Zellwandpolysacchariden.^[13,46,209] Aber auch die Gelbildung durch oxidative Vernetzung der Ferulasäuregruppen, untersucht von *Thibault*, 1986 und *Oosterveld et al.*, 2000.^[210,211] Diese Derivate zeigen eine Präferenz, Hydrogele auszubilden. Neuere Ansätze zur Synthese von Hydrogelen sind beispielsweise die von *Semd et al.* im Jahr 2003 untersuchte Umsetzung mit Epichlorhydrin.^[212] Dabei wurde der Methylester zuerst gespalten, um das Natriumpektinat zu erzeugen, welches dann alkalisch mit Epichlorhydrin

2 Allgemeiner Teil

umgesetzt wurde (Abbildung 29). Die vernetzten Derivate zeigen eine verringerte Wasserlöslichkeit und wurden erfolgreich für eine spezifische Wirkstofffreisetzung im Dickdarm getestet. Die Freisetzung des Wirkstoffes erfolgt durch den enzymatischen Abbau der Pektine im Körper. Allerdings steht die Toxizität von Epichlorhydrin dem kommerziellen Einsatz im Weg.

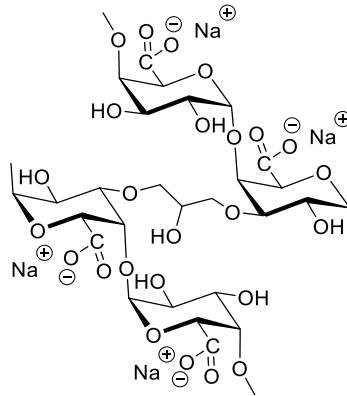


Abbildung 29: Schematische Darstellung zweier vernetzter HG-Einheiten nach der Umsetzung mit Epichlorhydrin.

Alternative Vernetzungsreagenzien wurden in den folgenden Jahren untersucht. *Yoshimura et al.* vernetzten 2005 Pektin mit Ethylenglykoldiglycidylether und Glutaraldehyd.^[213] Und *Li et al.* vernetzten entestertes Pektin unter Verwendung von Adipinsäure (Abbildung 30).^[214]

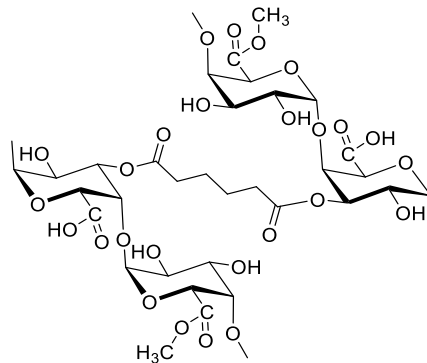


Abbildung 30: Schematische Darstellung zweier vernetzter HG-Einheiten nach der Umsetzung mit Adipinsäure.

Die erhaltenen Produkte zeigten eine hohe Adsorptionskapazität zur Entfernung von Schwermetallen, wie Pb²⁺ oder Cu²⁺, und können somit für die Abwasserreinigung verwendet werden. *Souto-Maior et al.*, 2010, beschäftigten sich mit der Umsetzung von Pektin mit Natriumtrimetaphosphat im basischen Medium und zur Vernetzung (Abbildung 31).^[215] Die erzeugten Reaktionsprodukte zeigen durch die Abnahme an hydratisierbaren Hydroxygruppen eine geringere Wasserlöslichkeit auf.

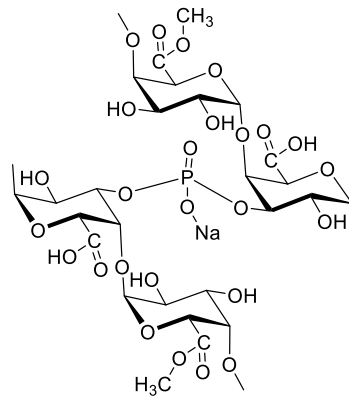


Abbildung 31: Schematische Darstellung zweier vernetzter HG-Einheiten nach der Umsetzung mit Natriumtrimetaphosphat.

Es gibt zudem eine Vielzahl von Möglichkeiten modifizierte Pektine zu vernetzen. *Mishra et al.* vernetzten 2008 amidierete Pektine mit einem Glutaraldehyd, um Hydrogele herzustellen.^[216] *Farris et al.* synthetisierten im Jahr 2011 Hydrogele durch die Zugabe von Gelatine zum Pektin. Durch die ionischen Wechselwirkungen zwischen positiv geladener Gelatine und negativ geladenem Pektin bildeten sich Hydrogele. Die anschließende Vernetzung wurde mit Glutaraldehyd durchgeführt, wobei die Vernetzungspunkte naturgemäß Hemiacetale sind. Das dabei entstehende polyionische Kompositmaterial weist eine geringe Quellneigung und verbesserte Zugfestigkeit auf.^[217] *Perera et al.* konnten 2010 zeigen, dass es möglich ist, thioliertes Pektin durch Oxidation der Thiolgruppen über Disulfidbindungen zu vernetzen.^[184,185] Eine Vernetzung durch Dihalogenalkane untersuchten *Matricardi et al.* 1995 durch die Umsetzung mit Substanzen wie 1,6-Dibromhexan, 1,3-Diodpropan und 1,10-Diododecan.^[131] Die Tatsache, dass sich oxidierte Pektine schneller verstoffwechseln lassen, wurde bereits in früheren Studien nachgewiesen. Dies gilt allerdings auch für weiter vernetzte oxidierte Pektine. 2010 vernetzten *Takei et al.* oxidierte Pektine mit Adipinsäuredihydrazid und stellten damit Hydrogele her.^[192] Die hierbei erhaltenen Derivate wurden mit Doxorubicin beladen und zeigten äußerst positive Ergebnisse beim Einsatz gegen Tumorzellen, da es bei der Verstoffwechselung der oxidierten und vernetzten Derivate zur Freisetzung von Doxorubicin kommt. Durch Periodat oxidierte Pektine lassen sich nach *Gupta et al.*, 2014 ebenfalls weiter zu vernetzten Pektin-Gelatine-Hydrogelen umwandeln.^[218] In den letzten Jahren sind zudem pektinhaltige Nanofasern in den Fokus der Forschung gerückt. 2017 beschäftigten sich *Cui et al.* mit der Vernetzung von Nanofasern, welche durch Electrospinning hergestellt wurden. Zum Einsatz kamen drei repräsentative Pektinvertreter (hochmethoxyliertes, niedrigmethoxyliertes und amidiertes

Pektin). In der Arbeit wurden verschiedene Vernetzungsansätze untersucht, von ionischer (Ca-Ionen) bis zu kovalenter Vernetzung mit Glutaraldehyd oder Adipinsäuredihydrazid. Mechanische Tests und Zersetzungsexperimente zeigten, dass die Pektinstruktur nach der Vernetzung deutlich stabiler ist als das native Material.^[219]

2.4 Analytische Methoden zur Charakterisierung von Pektin

Die Extraktion von Pektin geschieht üblicherweise durch sequentielle Extraktionsschritte mit verschiedenen wässrigen Puffern.^[18] Das Molekulargewicht von Pektin kann mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie ermittelt werden, wobei sich als Näherung Pullulanstandards etabliert haben. Diese besitzen zwar nicht das identische hydrodynamische Volumen, werden allerdings standardisiert verwendet. Die Zusammensetzung, wie der Methylierungs- und Acetylierungsgrad des Pektins, kann durch verschiedene Analysen bestimmt werden.^[220–224] Das Verständnis des DE ist einer der wichtigsten Aspekte der Strukturforschung am Pektin. Es beruht auf der ausgezeichneten Korrelation des DE mit der molekularen Konformation und den daraus resultierenden Eigenschaften des Pektins. Zur Bestimmung des DE wird am häufigsten die Leitfähigkeitstitation verwendet.^[224–226] Eine alternative Methode ist die Bestimmung von Methanol durch Spaltung des Esters mittels Enzymen oder Behandlung mit Säuren. Das freigesetzte Methanol wird anschließend durch Chromatographie bestimmt.^[224] Die Größenausschlusschromatographie (GPC) mit Refraktions- und Leitfähigkeitsdetektoren zur Bestimmung des DE von Pektinen ist ebenfalls bekannt.^[227,228] Anfang des 20. Jahrhunderts wurde bereits festgestellt, dass Pektin neben Methyl- auch Acetylgruppen enthalten kann, zudem wurde die synthetische Einführung von Acetylgruppen zunehmend interessanter. Eine Vielzahl von Forschern beschäftigte sich mit Methoden, die meist auf Verseifung oder Nitrierung und anschließender Elementaranalyse oder Titration beruhten.^[229–235] 1957 entwickelten *McComb und McCready* ein Verfahren zur Bestimmung der Estergruppen mit alkalischem Hydroxylamin und Eisenionen, wobei sich ein löslicher roter Komplex bildet, der kolorimetrisch bestimmt werden kann.^[236] 1975 beschrieben *Mizote et al.* die Bestimmung des Acetylierungsgrades durch Kolloidtitration mit Cat-Floc (Poly-*NN*-dimethyldiallylammoniumchlorid) und Natriumhydroxid.^[237] Eine weitere Möglichkeit stellt

die Kapillarelektrophorese dar. Da Pektin ein Polyelektrolyt ist, besteht eine Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität von der mittleren Ladung des Polysaccharides. ^[238–240] Ein Vorteil der Methode gegenüber der Chromatographie ist die einfache und schnelle Durchführung. Diese Analysen, die am gesamten Molekül durchgeführt werden, reichen jedoch nicht aus, um Einblick in die Pektinstruktur zu geben. Daher wird Pektin häufig durch chemische oder enzymatische Behandlung abgebaut. Dieser Abbau führt zu zwei Effekten. Nach der Fraktionierung der Abbauprodukte können „reine“ Strukturelemente erhalten werden. Die resultierenden Oligomere lassen sich leichter als das Makromolekül selbst mit einer Vielzahl analytischer Techniken, wie beispielsweise der Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie (HPAEC), der Kapillarelektrophorese (KE) und der Massenspektrometrie (MS) untersuchen. ^[31] Bei Verwendung von HPAEC werden Zuckeroligosaccharide nach Ladungsunterschieden getrennt. Die Trennung wird bei pH 12 durchgeführt, um sicherzustellen, dass auch neutrale Zucker geladen werden. Die negativ geladenen Zucker wechselwirken mit dem Säulenmaterial und eluieren mit zunehmendem Salzgradienten. ^[241] Alternativ können Pektin-Oligosaccharide bei einem pH-Wert von 5 analysiert werden. Dabei erhält man Informationen über die Methylesterverteilung entlang des Rückgrates. ^[30] Nach der Elution werden die Zucker häufig amperometrisch nachgewiesen. ^[241] Eine alternative Möglichkeit zur Trennung von Pektin-Oligosacchariden kann durch KE bei hohem pH-Wert oder durch Einführung von Ladungen unter Kopplung von Pektin-Oligosacchariden an einen geladenen Marker erreicht werden. ^[242,243] Sowohl bei HPAEC- als auch bei KE-Techniken werden Standards zur Kalibration der Methode eingesetzt. ^[241,242] Für viele komplexe Oligosaccharide stehen jedoch keine Standards zur Verfügung. Eine Lösung dafür ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zur Fraktionierung und anschließender Analyse mittels MS. ^[244] Die Kombination einer geringen Probenmenge zusammen mit intrinsischen Schwierigkeiten bei der Fraktionierung macht die KE für eine sequenzielle MS-Analyse weniger geeignet. Daher ist HPAEC die am häufigsten verwendete Methode zur Identifizierung von Pektin-Oligosacchariden, manchmal in Kombination mit Offline-MS. Matrixgestützte Laserdesorption-Ionisation (MALDI-)MS wird aufgrund ihrer Toleranz gegenüber restlichen Salzen, der relativ einfachen Probenvorbereitung und der hohen Analysegeschwindigkeit häufig für die Offline-MS-Analyse verwendet. ^[30] Mit dieser Technik, oder alternativ mit nachgeschalteter Ionenfalle, können Oligosaccharidmassen und deren Fragmentierungsprodukte bestimmt

2 Allgemeiner Teil

werden.^{[245][246]} Es ist klar, dass die Struktur von Pektin nicht auf der Grundlage von Ergebnissen einer einzelnen Analysemethode dekodiert werden kann, sondern eine Kombination verschiedener Analysemethoden mit diversen Probenpräparationen erforderlich ist. Besonders aber ^{13}C - und ^1H -Kernmagnetresonanz (NMR)-spektroskopische Untersuchungen wurden bei diesen Strukturaufklärungen vielfach eingesetzt.^[74,78] XRD-Untersuchungen an Pektinen führen häufig nur zu Faserbeugungsdiagrammen, da Pektine im Gegensatz zur Cellulose meist nicht kristallisieren. In letzter Zeit wurde jedoch eine Vielzahl von experimentellen Untersuchungen mit einer langkettigen Pektinstruktur für Untersuchungen im Festkörper mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM),^[247] Faser-Diffraktometrie,^[86] Rasterkraftmikroskopie (AFM),^[248] ^{13}C -NMR, Neutronenstreuung mit kleinem Winkel oder Röntgenstreuung mit kleinem Winkel^[76,122] beschrieben.^[89,249] Aber auch Untersuchungen im flüssigen Zustand mittels Lichtstreuung,^[250] Viskosimetrie^[251–253] und ^{23}Na -NMR wurden durchgeführt^[254], sowie Potentiometrie und Zirkulardichroismus-Spektroskopie^[255]. Einige dieser Studien wurden mit theoretischen Untersuchungen gekoppelt, in denen günstige Formen der Kettenausbreitung, Verknüpfungen zwischen Ketten und Wechselwirkungen von Pektinen mit zweiwertigen Kationen untersucht wurden. Für die Analyse der in dieser Arbeit synthetisierten Proben wurde hauptsächlich die NMR-IR-Spektroskopie hinzugezogen.^[105,161] Die GPC diente zur Charakterisierung der Edukte und Produkte.

3 Spezieller Teil

3.1 Acetylierung von Pektin und Polygalacturonsäure

Die Acetylierung von Polysacchariden ist ein intensiv bearbeitetes Feld in der chemischen Industrie. Speziell die Acetylierung von Pektinen oder der Polygalacturonsäure ist im Vergleich zur Acetylierung von Cellulose oder Stärke weit weniger untersucht worden. Bis heute hat sich keine industrielle Anwendung für acetylierte Pektine gefunden. Interessant ist die Synthese von Acetylpektinen jedoch in mehrerlei Hinsicht. Zum einen kann eine Hydrophobierung des Pektinrückgrates durch kostengünstige Chemikalien (Essigsäureanhydrid / Acetylchlorid) realisiert werden. Weiter erlaubt eine Erhöhung des hydrophoben Charakters des Pektins, bei niedrigen DS-Werten, einen schnelleren Wasseraustritt bei einer Gelbildung, was zu stabileren ionotropen Gelen führt. Und letztendlich soll, in der für diese Arbeit betrachteten technischen Anwendung, der sich bildende Gelfilm aus Acetylpektin den Korrosionsschutz bei der Beschichtung einer Metalloberfläche erhöhen. Dies wird durch einen Tauchvorgang in eine Pektin-enhaltende Polymerdispersion, wodurch sich ein Gelfilm ausbildet, mit anschließender Trocknung und Korrosionsprüfung untersucht. Als wichtiger Punkt ist hierbei zu nennen, dass die Esterbildung nur bei geringem DS die Fähigkeit zur Gelbildung nicht unterbindet. Wird der DS zu stark erhöht ($DS > 0,3$, abhängig von der Konzentration), verliert das Material erst seine gelbildenden Eigenschaften und später sogar die Wasserlöslichkeit. Die in dem folgenden Abschnitt beschriebene Studie beschäftigt sich mit der Acetylierung der Hydroxygruppen des Pektinrückgrats. PGaIS dient hierbei als Beispiel für ein idealisiertes Pektinrückgrat, aufgebaut ausschließlich aus HG-Einheiten. In der Literatur zwischen 1996 und 2008 wurde vielfach beschrieben, dass Pektine von Natur aus häufig an der Carboxygruppe methyliert vorliegen, jedoch eine Veresterung mit Essigsäure über die Hydroxygruppen an der C2- und C3-Position der Wiederholungseinheit nur selten bis gar nicht vorliegt.^[9,31,161,256,257]

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen wurden drei Ausgangsstoffe verwendet. Zum einen zwei Zitruspektine mit den Veresterungsgraden von 30 % (CP7, DM von 0,3) und 10 % (CP9, DM von 0,1), sowie eine reine Polygalacturonsäure (PGaIS, DM von 0). Die Verbindungen wurden in einer Eingangsprüfung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie

3 Spezieller Teil

untersucht. ^1H - sowie ^{13}C -NMR-Spektren wurden aufgenommen. Die erhaltenen Signale sind in Abbildung 32 und Abbildung 33 dargestellt.

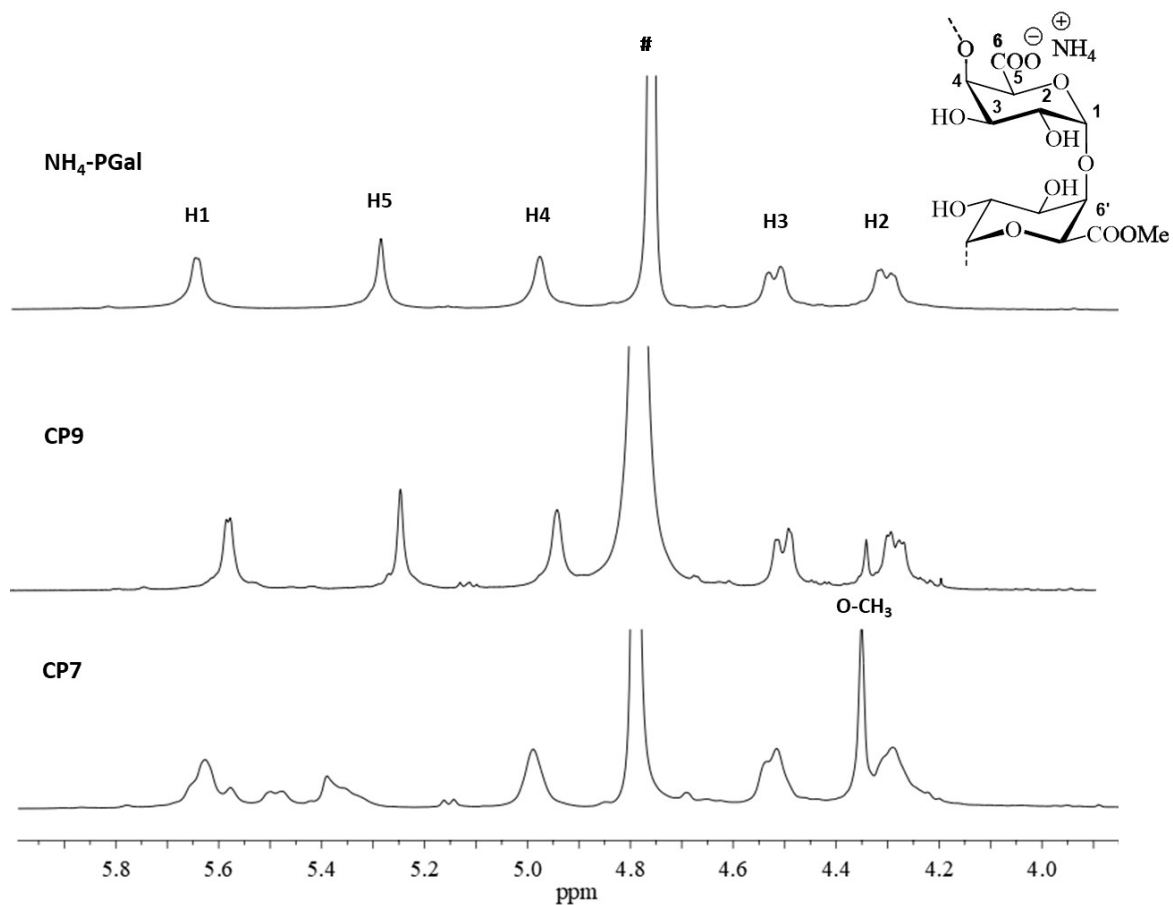


Abbildung 32: ^1H -NMR-Spektrum von Ammoniumpolygalacturon ($\text{NH}_4\text{-PGal}$), Ammoniumpektinat CP9 (DM von 0,1) und Ammoniumpektinat CP7 (DM von 0,3) gemessen in D_2O .

In den ^1H -NMR-Spektren der drei Pektine lassen sich eindeutig die Peaks der Anhydrogalacturonsäure-Einheit (AGE) zuordnen. Für Polygalacturonsäure sind die Signale für H2, H3, H4, H5 und H1 gut aufgelöst bei 4,34; 4,49; 4,99; 5,29 und 5,64 ppm zu erkennen. Mit zunehmendem Methylierungsgrad werden die Signale der AGE unschärfer und es zeigen sich weitere Signale (CP9 und CP7). Hierbei handelt es sich um das Methylsignal des Methylesters (4,36 ppm) sowie Signale von zusätzlichen Seitenketten (4,69; 5,15 und 5,49 ppm), wie sie sich in allen Pektinen finden lassen. Auf diese Rhamnogalacturonsäureeinheiten wird im weiteren Verlauf jedoch nicht näher eingegangen. In den ^{13}C -NMR-Spektren ist die Zuordnung der AGE bei allen drei Proben ebenfalls eindeutig zu treffen. Es zeigt sich, dass bei CP9 ein charakteristischer Peak für die Methoxygruppe bei 53 ppm erkennbar ist, allerdings kommt es noch zu keiner Aufspaltung des Carboxylsignals (C6). Bei einem DM von 0,3 lassen sich sowohl der charakteristische O-CH₃ Peak bei 53 ppm

3 Spezieller Teil

als auch die Aufspaltung der Carboxygruppe in einen veresterten Anteil C6' und in einen als Salz vorliegenden Anteil C6 erkennen. Wiederum zeigt sich neben den intensivsten Signalen der AGE in den beiden Pektinen (CP7 und CP9), dass weitere Signale aus dem Rauschen hervortreten, welche jedoch nicht zugeordnet werden konnten.

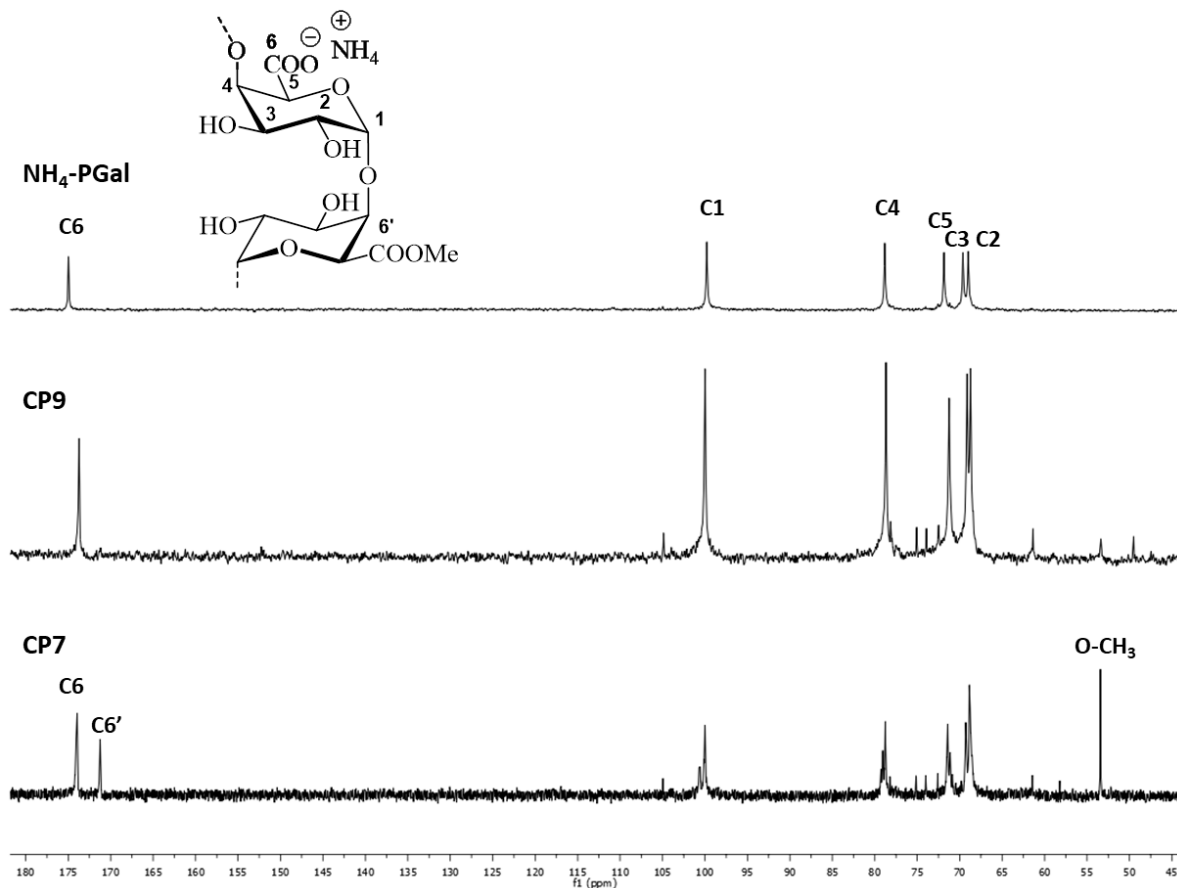


Abbildung 33: ^{13}C -NMR-Spektrum von Ammoniumpolygalacturon ($\text{NH}_4\text{-PGal}$), Ammoniumpektinat CP9 (DM von 0,1) und Ammoniumpektinat CP7 (DM von 0,3) gemessen in D_2O .

Die Proben wurden auch durch Größenausschlusschromatographie (GPC) analysiert (Abbildung 34). Dafür wurde die Polygalacturonsäure mittels Ammoniak in ihre wasserlösliche Ammoniumform überführt. Bei der Analyse zeigte sich, dass der Methylierungsgrad mit der Molmasse korreliert, bei geringeren DM ist auch die Molmasse kleiner. Dies kann auf den Aufarbeitungsprozess zurückgeführt werden. Durch die Esterspaltung kommt es gleichermaßen zur teilweisen Spaltung der glykosidischen Bindungen, was eine geringere Molmasse zur Folge hat.

Die Acetylierung der Pektine wurde homogen in Formamid durchgeführt. Als Acetylierungsreagenzien wurde eine Reihe von Verbindungen getestet, die sich in der Literatur bereits für diese Polysaccharidklasse bewährt hatten, aber auch neuere

3 Spezieller Teil

Reagenzien, die noch nicht für Pektine untersucht wurden. Dadurch sollte sich eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen und der bereits bestehenden Literatur ergeben.

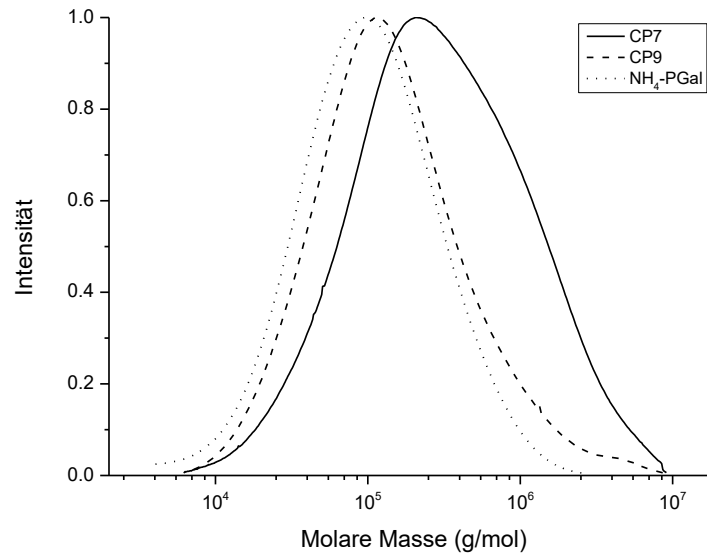


Abbildung 34: Größenausschlusschromatographie von Ammoniumpolygalacturonat ($\text{NH}_4\text{-PGal}$), Pektin CP9 und Pektin CP7 in Wasser.

Die acetylierten Derivate wurden charakterisiert und hinsichtlich ihrer Struktur-Eigenschaftsbeziehung in Abhängigkeit vom DS untersucht. Wie zuvor beschrieben gibt es zum Thema Acetylierung im Zusammenhang zur Ausbildung von ionischen Gelen bereits wissenschaftliche Arbeiten.^[150,236,105,161] Diese Arbeiten decken allerdings nicht die Untersuchung verschiedener Ausgangsstoffe in Kombination mit einer Variation an Acetylierungsreagenzien und deren Einfluss auf multivalente Metallionen ab, wie in der Einleitung der vorliegenden Dissertation detailliert beschrieben. Bekannt ist, dass durch die Einführung von wenigen Acetylgruppen die Derivate auch in der Säureform wasserlöslich werden und bei höherer Veresterung ($\text{DS} > 0,8$) auch in organischen Lösungsmitteln löslich werden können. Für die in dieser Studie durchgeführten Acetylierungen wurden drei verschiedene Reagenzien zur Veresterung untersucht: Essigsäureanhydrid, Acetylchlorid und Essigsäurevinylester (siehe Abbildung 35). Diese unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Reaktivität als auch bezüglich der Hydrolyseempfindlichkeit. Arbeiten von *Renard und Javis*, die sich bereits mit Acetylierungen an Pektinen befasst haben, zeigen, dass ein $\text{DS} > 1$ zu einem völligen Verlust der Gelbildung führt. Diese Betrachtung ist mit der Hypothese zu

3 Spezieller Teil

erklären, dass für die Interaktion mit bivalenten Metallionen sowohl eine Carboxy- als auch eine Hydroxygruppe benötigt wird.^[105,161]

Die Umsetzung der Ausgangsstoffe erfolgte in Formamid bei erhöhten Temperaturen und unter Zusatz von Pyridin als Base. Dieses Vorgehen wurde für alle Acylierungsmittel gewählt, jedoch wurde Acetylchlorid unter Kühlung zum Reaktionsgemisch hinzugegeben, bevor es erhitzt wurde.

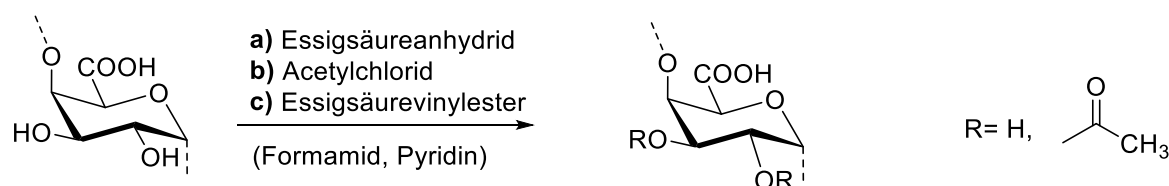


Abbildung 35: Schema der Acetylierung mit Übersicht der verschiedenen Acetylierungsreagenzien.

Aus weiteren Untersuchungen dieser Arbeit geht bereits hervor, dass sowohl PGaIS als auch Pektin trotz entsprechend langer Trocknung bei erhöhter Temperatur unter Vakuum eine Restfeuchte von ~1 % aufweisen. Dies wurde durch TGA-Untersuchungen bestätigt. Die Acylierungsreagenzien wurden deshalb teilweise in hohem Überschuss eingesetzt, um den Effekt der Restfeuchte und daraus resultierender Hydrolyse der eingesetzten Reagenzien entgegenzuwirken. Bei der Reaktion mit Acetylchlorid, 10 h bei 50 °C mit 10,0 Äquivalente, wurde der DS von 1,0 überschritten, das Derivat **Ac 7**, mit dem DS von 1,2 zeigte keine Eigenschaft der ionogenen Gelbildung mehr auf.

Die beiden Pektine und Polygalacturonsäure wurden mit Essigsäureanhydrid umgesetzt. Die Umsetzungen mit Acetylchlorid und Essigsäurevinylester erfolgten nur mit Polygalacturonsäure. Generell lässt sich der Trend beobachten, dass Acetylchlorid die höchste Reaktivität von allen untersuchten Acylierungsmitteln aufweist. Die Verbindung reagiert teilweise heftig mit Nucleophilen. Auch Formamid kann mit dieser reaktiven Substanz Nebenreaktionen eingehen. Diese Nebenreaktionen wurden bereits in der Literatur beschrieben, jedoch nicht völlig aufgeklärt. Bekannt ist, dass diese Formamidnebenprodukte keinen Einfluss auf die zu acylierende Polygalacturonsäure nehmen.^[258] Die maximal erreichten DS-Werte für die drei Acylierungsmittel Ac_2O , AcCl und AcV sind DS 0,7; 1,1 und 0,2. Bei niedrigen Reagenzmengen (bis 5,0 Äquiv.) sind die erreichten DS-Werte zwischen Acetylchlorid und Ac_2O vergleichbar. Aus Tabelle 2 geht hervor, dass bei Reaktionszeiten von

3 Spezieller Teil

5 h und Reagenzmengen von 1,0; 2,5 und 5,0 Äquiv. die DS-Werte für beide Reagenzien bei $DS < 0,1$; 0,1 und 0,3 (Ac_2O) / 0,4 ($AcCl$) liegen.

Tabelle 2: Reaktionsparameter für die Acetylierung von CP7, CP9 und PGaIS mit Essigsäureanhydrid, Acetylchlorid und Essigsäurevinylester. Die hier gezeigten Produkte sind wasserlöslich.

Edukt		Reaktionsparameter			Produkt	
Edukt	Reagenz ¹	Reagenz ² [Äq.]	Zeit [h]	Temp. [°C]	Nr.	DS ³
CP7	Ac_2O	0,5	5	50	Ac 1	< 0,1
CP7	Ac_2O	1	5	50	Ac 2	< 0,1
CP7	Ac_2O	2,5	5	80	Ac 3	0,5
CP7	Ac_2O	2,5	12	80	Ac 4	0,5
CP7	Ac_2O	5	5	50	Ac 5	0,8
CP7	Ac_2O	10	5	50	Ac 6	1,0
CP7	Ac_2O	10	12	80	Ac 7	1,2
CP9	Ac_2O	0,5	5	50	Ac 8	< 0,1
CP9	Ac_2O	1	5	50	Ac 9	< 0,1
CP9	Ac_2O	2,5	5	50	Ac 10	0,1
CP9	Ac_2O	5	5	50	Ac 11	0,4
CP9	Ac_2O	10	5	50	Ac 12	0,8
CP9	Ac_2O	10	12	80	Ac 13	0,9
PGaIS	Ac_2O	0,5	5	50	Ac 14	< 0,1
PGaIS	Ac_2O	1	5	50	Ac 15	< 0,1
PGaIS	Ac_2O	2,5	5	50	Ac 16	0,1
PGaIS	Ac_2O	5	5	50	Ac 17	0,3
PGaIS	Ac_2O	10	5	50	Ac 18	0,6
PGaIS	Ac_2O	10	12	80	Ac 19	0,7

¹ Ac_2O – Essigsäureanhydrid; ² Äquivalente Reagenz immer bezogen auf eine Anhydrogalacturonsäure-Einheit; ³ DS – Substitutionsgrad

3 Spezieller Teil

Bei höheren Reagenzmengen zeigen sich stärkere Unterschiede in der Reaktivität, wobei Acetylchlorid, wie bereits erwähnt, zu einem höheren Umsetzungsgrad führt als Essigsäureanhydrid. Bei 10 Stunden Reaktionszeit (80 °C) und jeweils 12 Äquiv. Reagenz ergeben sich die DS-Werte für die Umsetzung von Ac₂O und AcCl mit PGaIS zu DS von 0,7 und 1,1, wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist.

Essigsäurevinylester zeigt eine geringere Reaktivität bei der Umsetzung mit Polygalacturonsäure (Abbildung 36).

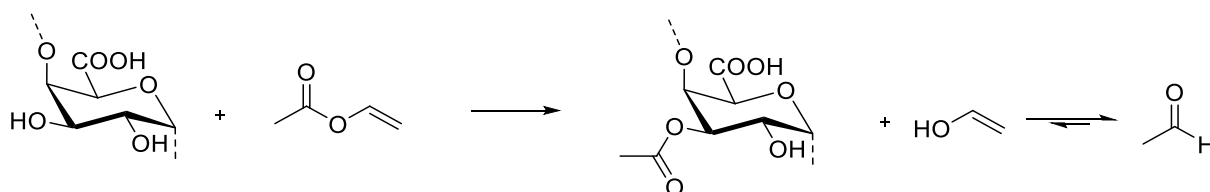


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Acetylierung von Polygalacturonsäure mit Essigsäurevinylester in Formamid.

Für das Derivat **Ac 29**, welches bei 50 °C für 5 h mit 5,0 Äquivalenten AcV umgesetzt wurde, wird lediglich ein DS von 0,1 erhalten. Bei dem Einsatz von 10,0 Äquiv. des Acylierungsmittel für 5 h bei 50 °C zeigte sich eine DS-Wertzunahme um lediglich 0,1 (**Ac 30**; DS 0,2) (siehe Tabelle 3). Damit scheint für Polygalacturonsäure im Rahmen der Untersuchung Essigsäurevinylester das ineffektivste Acylierungsmittel zu sein. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich in der Umesterungsreaktion zu suchen. Im Gegensatz zu den beiden anderen Acylierungsmitteln wird hier bei der Aktivierung keine reaktive Acylierungsspezies gebildet, welche als eigentliches aktives Acylierungsagens angesehen werden kann. Eine Gleichgewichtsverschiebung durch Keto-Enolautomerie des entstehenden Vinylalkohols verschiebt das Gleichgewicht auf die Produktseite, hierfür muss aber bereits die nucleophile Hydroxylfunktion der PGaIS am Essigsäurevinylester angegriffen haben. Umsetzungen mit Acetylchlorid führen zu den höchsten DS-Werten bei diesen Untersuchungen, wobei eine vollständige Veresterung der PGaIS mit Acetylresten nicht gelang. Essigsäureanhydrid als Acylierungsreagenz liegt mit seiner Reaktivität zwischen den beiden anderen Acylierungsmitteln und ist aus Kostengründen für die Umsetzung von PGaIS für niedrige DS-Werte am sinnvollsten.

3 Spezieller Teil

Tabelle 3: Reaktionsparameter für die Acetylierung von PGaIS mit Acetylchlorid und Essigsäurevinylester. Die hier gezeigten Produkte sind wasserlöslich.

Edukt		Reaktionsparameter			Produkt	
Edukt	Reagenz ^{1,2}	Reagenz ³ [Äq.]	Zeit [h]	Temp. [°C]	Nr.	DS ⁴
PGaIS	AcCl	1	5	RT	Ac 20	< 0,1
PGaIS	AcCl	2,5	5	50	Ac 21	0,1
PGaIS	AcCl	5	5	50	Ac 22	0,4
PGaIS	AcCl	10	5	50	Ac 23	0,8
PGaIS	AcCl	10	12	80	Ac 24	1,1
PGaIS	AcCl	15	12	80	Ac 25	1,2
PGaIS	AcV	0,5	5	50	Ac 26	< 0,1
PGaIS	AcV	1	5	50	Ac 27	< 0,1
PGaIS	AcV	2,5	5	50	Ac 28	< 0,1
PGaIS	AcV	5	5	50	Ac 29	0,1
PGaIS	AcV	10	5	50	Ac 30	0,2

¹ AcCl – Acetylchlorid; ² AcV – Essigsäurevinylester; ³ Äquivalente Reagenz immer bezogen auf eine Anhydrogalacturonsäure-Einheit, ⁴ DS – Substitutionsgrad

Im Vergleich zur PGaIS konnte mit den Produkten aus der Umsetzung von Ac₂O und den beiden untersuchten Pektinen höhere DS erzielt werden. Tabelle 2 zeigt, dass CP7 bereits bei 2,5 Äquiv. Ac₂O, bei 5 Stunden Reaktionszeit und bei 50 °C einen DS-Wert von 0,5 aufweist (**Ac 3**). CP9 zeigt hingegen, genau wie PGaIS unter diesen Bedingungen, noch einen DS von 0,1. Bei Essigsäureanhydridmengen von 10,0 Äquiv. und Reaktionszeiten von 12 h zeigt sich die unterschiedliche Reaktivität der eingesetzten Polysaccharide am besten. Die Werte steigen von DS 0,7 über 0,9 bis hin zu 1,2 für Polygalacturonsäure (**Ac 19**), Pektin CP9 (**Ac 13**) und Pektin C7 (**Ac 7**).

In weiteren Reaktionen wurde untersucht, ob sich DMA und DMF als Reaktionsmedien für die Acylierung von PGaIS eignen. Diese Lösungsmittel sind stabiler gegenüber Acylierungsmitteln als Formamid, führen jedoch zu einer heterogenen Umsetzung. Diese heterogene Reaktionsführung zeigte leider nicht reproduzierbare Ergebnisse. Weiter führt

3 Spezieller Teil

eine heterogene Reaktionsführung zu einer schlechteren Durchmischung der Reaktanden und dadurch ergaben sich tendenziell niedrigere DS bei den Umsetzungen. Zusätzlich gestaltete sich die Aufreinigung der Reaktionsprodukte als schwierig, da sich die Materialien verklumpten und nur schwer von eingeschlossenen Verunreinigungen befreit werden konnten.

Zum qualitativen Nachweis der Acetylierung ist die Infrarotspektroskopie sehr gut geeignet. Zunächst wurde ein Spektrum von PGaIS aufgenommen (Abbildung 37a), das den Erwartungen entsprechend das Signal C=O Streckschwingung 1742 cm^{-1} der Carboxygruppe zeigte. Das synthetisierte Natriumpolygalacturonat (Abbildung 37b) weist aufgrund der Carboxylatbildung eine Verschiebung der C=O-Streckschwingung zu niedrigeren Wellenzahlen 1620 cm^{-1} auf. Zum Einfluss des Metallions auf die Verschiebung der C=O Streckschwingung des Polygalacturonsäuresalzes im Infrarotspektrum gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen.^[108,153,259,260] Bei der acetylierten PGaIS konnte erneut die C=O-Streckschwingung 1742 cm^{-1} nachgewiesen werden (Abbildung 37c), die hier jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden kann, da diese sowohl aus der C=O-Gruppe der Carbonsäure als auch aus der C=O-Gruppe der Acetylfunktion hervorgehen kann. Im Spektrum gibt es jedoch immer noch eine bestimmte Schwingung der Acetylgruppe, die C-O-C-Valenzschwingung bei 1240 cm^{-1} . Um zu zeigen, dass unter dem IR-Signal bei 1742 cm^{-1} zwei Signalsätze zu finden sind (C=O Acetyl und C=O PGaIS), wurde das acetylierte PGaIS in die Natriumsalzform überführt. Jetzt erkennt man für das Na-PGal und das Acetyl-PGal, dass die beiden Signale nebeneinander vorliegen (Abbildung 37d). Die C=O-Valenzsignale bei 1620 cm^{-1} und 1742 cm^{-1} lassen sich eindeutig der Acetyl C=O- und der Carboxylat C=O-Gruppe zuordnen.

Die in Tabelle 2 und Tabelle 3 zusammengefassten DS-Werte wurden mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt. In Abbildung 38 ist das ^1H -NMR-Spektrum von **Ac 16**, aufgenommen in Deuteriumoxid, dargestellt.

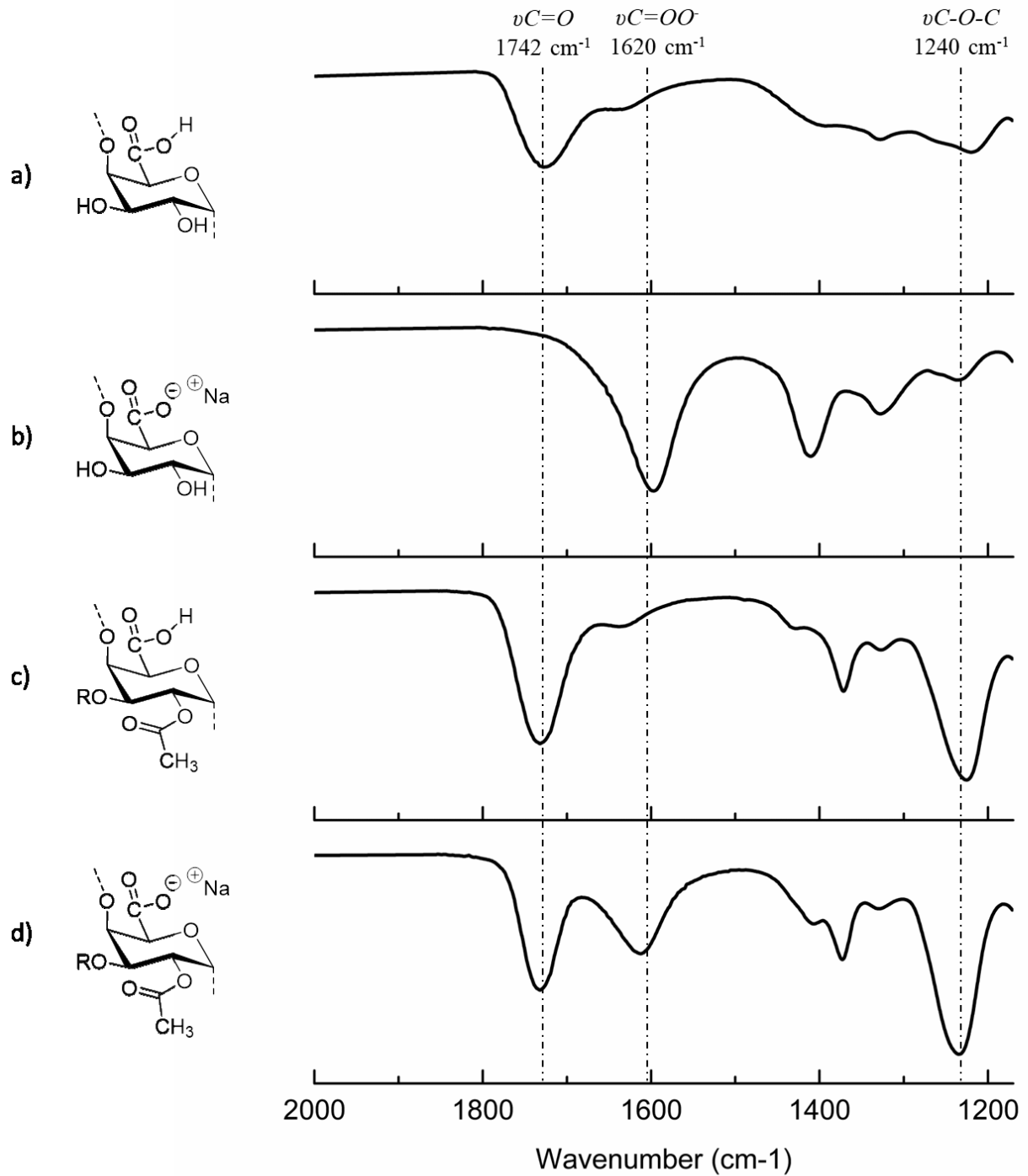


Abbildung 37: Infrarotspektren a) Polygalacturonsäure, b) Natrium Polygalacturonat, c) acetylierte Polygalacturonsäure und d) Acetylpoylgalacturonsäure Natriumsalz.

Die AGE ist mit ihren charakteristischen fünf Signalen zwischen 5,60 ppm und 4,00 ppm eindeutig zuordenbar. Das Signal für die Acetylgruppe findet sich bei 2,50 ppm im Spektrum.

3 Spezieller Teil

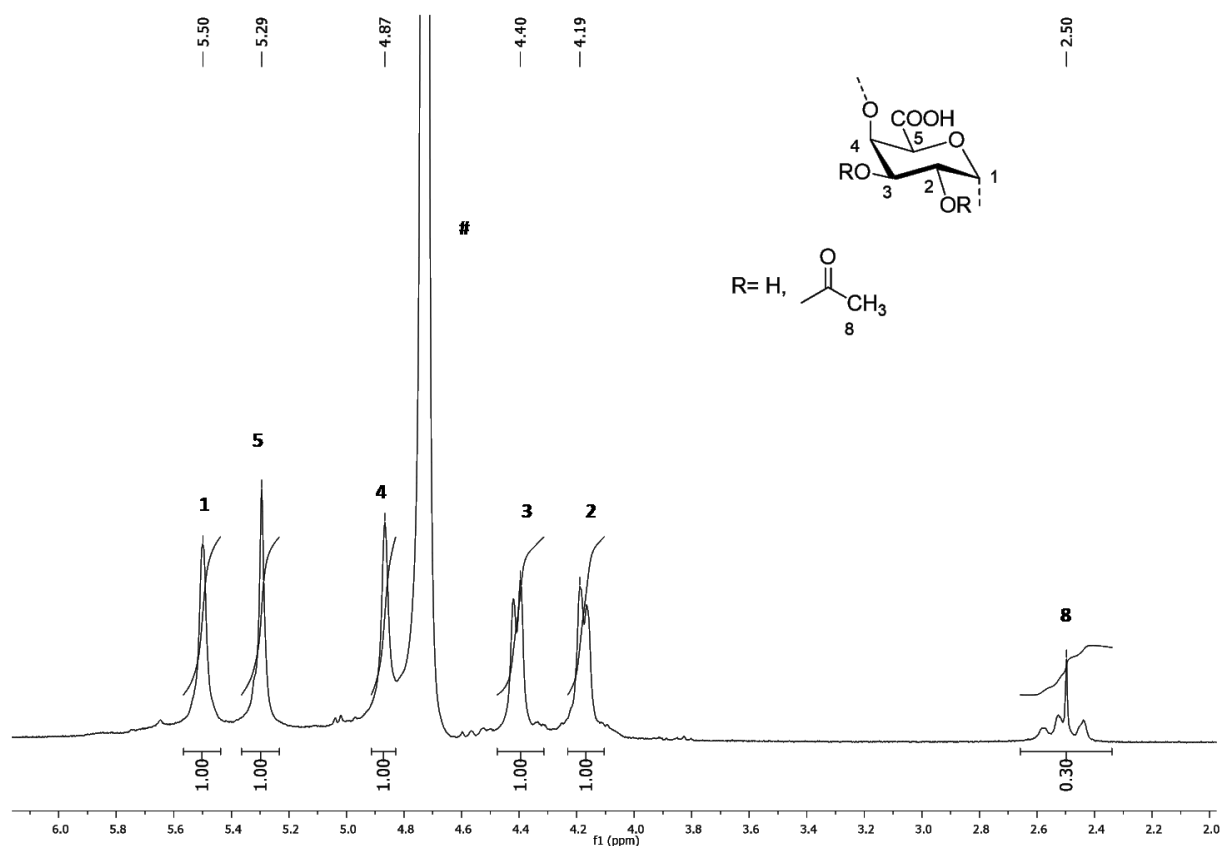


Abbildung 38: ^1H -NMR-Spektrum von acetylierter Polygalacturonsäure (**Ac 16**), erhalten durch die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid (Ac_2O), gemessen in D_2O .

In Abbildung 39 wird das ^1H -NMR-Spektrum eines höher substituierten PGals-Derivates (**Ac 22**) gezeigt. Die Signale für die Wiederholungseinheit des Polysaccharidrückgrates sind wesentlich breiter und weniger gut aufgelöst als bei niedrigem DS. Im Aliphatenbereich finden sich zwei Signale zwischen 2,20 ppm und 2,50 ppm. Diese Signale können den Acetylgruppen zugeordnet werden, die statistisch mit den Hydroxygruppen am C2 oder C3 der Wiederholungseinheit reagieren können.

Alle Proben wurden zudem durch Größenausschlusschromatographie (GPC) analysiert. In Abbildung 40 ist ein Vergleich zwischen der Umsetzung mit Acetylchlorid und Essigsäureanhydrid bei gleichen Reaktionsparametern dargestellt. Als Referenz wurde das wasserlösliche Natriumpolygalacturonat (Na-PGal) eingesetzt. Die zahlenmittlere Molmasse (M_n) der acetylierten Proben ist erwartungsgemäß geringer, was auf einen Abbau während der Reaktion rückschließen lässt (Tabelle 4). Die ermittelten Molmassen M_n zeigen, dass das Polymer während der Umsetzung mit Acetylchlorid weniger abgebaut wird als im Vergleich zur Umsetzung mit Essigsäureanhydrid.

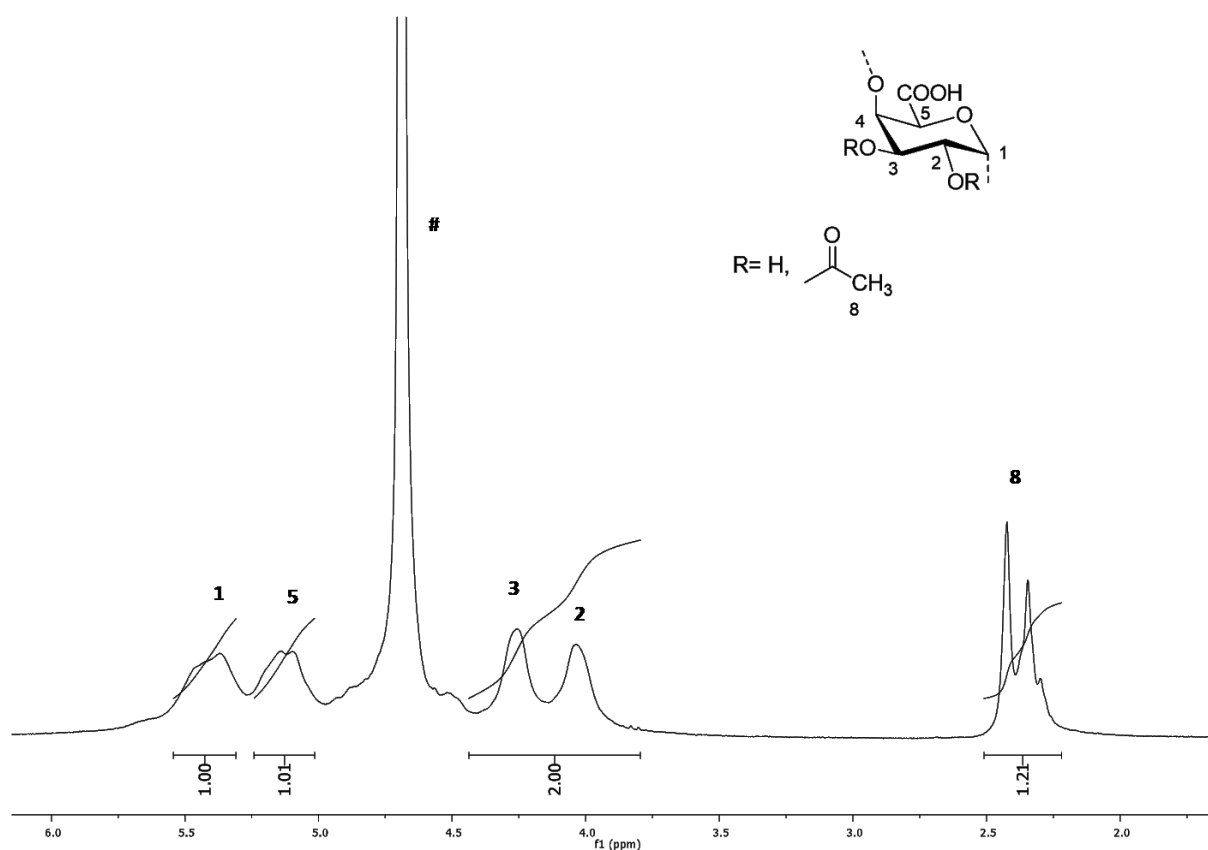


Abbildung 39: ^1H -NMR-Spektrum von acetylierter Polygalacturonsäure (Ac 22), erhalten durch die Umsetzung mit Acetylchlorid (AcCl), gemessen in D_2O .

Das Natriumpolygalacturonat besitzt ein M_n von $36.200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, wenn man mit Pullulan als Standard kalibriert. Die mit Acetylchlorid im Vergleich a) (Tabelle 4) behandelte, nach Regeneration und Umwandlung in die Natriumform gelöste Probe besitzt ein M_n von $29.200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, die mit Essigsäureanhydrid umgesetzte Probe dagegen $9.200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabelle 4: Zahlenmittel der Molmasse (M_n) und Polydispersität (\bar{D}) von Natriumpolygalacturonat und Polygalacturonsäure, behandelt im Vergleich a) bei 50°C für 5 h mit je 5,0 Äq. Acetylchlorid (AcCl) und Essigsäureanhydrid (Ac_2O) und Vergleich b) bei 50°C für 5 h mit je 10,0 Äq. Acetylchlorid (AcCl) und Essigsäureanhydrid (Ac_2O).

Probe	Vergleich a)			Vergleich b)	
	Na-PGal	AcCl	Ac_2O	AcCl	Ac_2O
		(Ac 22)	(Ac 17)	(Ac 23)	(Ac 18)
$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	36 200	29 200	9 200	28 600	8 100
\bar{D}	5,0	2,5	1,6	2,2	1,4

Dasselbe Einflussverhalten der Acetylierungsmittel wurde im Vergleich b) gefunden, wo die doppelte Menge an Reagenz verwendet wurde. Die Synthese mit Essigsäureanhydrid führt

3 Spezieller Teil

zu einem starken Abbau des Polysaccharids, wodurch sich auch die Polydispersität stark verringert.

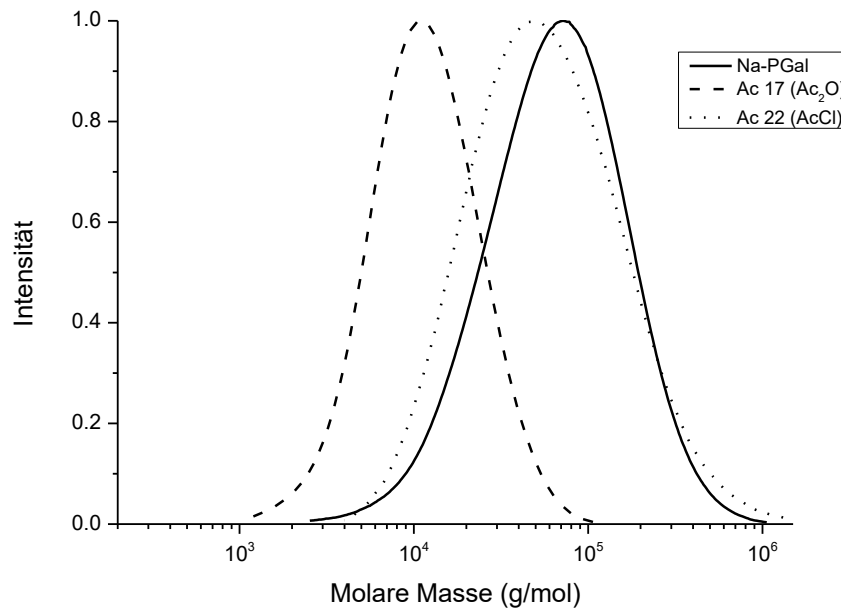


Abbildung 40: Elutionskurven von Natriumpolygalacturonat und Polygalacturonsäure, behandelt bei 50 °C für 5 h mit je 5,0 Äq. Acetylchlorid (AcCl) **Ac 22** und Essigsäureanhydrid (Ac_2O) **Ac 17**, gemessen in Wasser.

Die Acetylierung von Polygalacturonsäure und Pektin mit Essigsäureanhydrid, Acetylchlorid und Essigsäurevinylester ließen sich in Formamid durchführen. Als reaktivstes Acylierungsmittel führte AcCl bei der Umsetzung mit PGals zu den höchsten DS-Werten. Essigsäureanhydrid hatte eine verminderte Reaktivität gegenüber PGals; Essigsäurevinylester besaß die mit Abstand geringste Reaktivität bei der Acetylierung. Die acetylierten Produkte wiesen je nach Syntheseweg Unterschiede in ihren Molmassen auf, hierbei ist bei Ac_2O ein starker Polymerabbau erkennbar. Dieser Abbau ist wesentlich geringer beim Einsatz von AcCl . Durch diesen Polysaccharidabbau werden auch die Gelbildungseigenschaften stark beeinflusst. Bei niedrigen DS-Werten ($\text{DS} < 0,3$) ist mit Eisen(II)-Ionen Gelbildung zu beobachten. Bei steigenden DS-Werten ($\text{DS} > 0,3$) kam es bei den Produkten aus der Ac_2O Umsetzung zu einer verminderten Gelbildung aufgrund des starken Polysaccharidabbaus. Höher substituierte Derivate ($\text{DS} > 1$) zeigten keine Gelbildung mehr sowie schlechtere Lösungseigenschaften in Wasser. Eine Löslichkeit in dipolar aprotischen Lösungsmitteln (ausgenommen Formamid) war jedoch auch bei diesen hoch-acetylierten Pektinen nicht zu beobachten.

3.2 Untersuchung zur ionischen Gelbildung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

Um den Abscheideprozess von Pektin bei der Metallkomplexierung besser verstehen zu können und die Frage zu klären, wie die sich bildende Gelschicht beschaffen ist, genauer, ob sich ein Polysaccharidgradient weg von der Metalloberfläche in das disperse Medium bildet, wurde Polygalacturonsäure mit einem Fluoreszenzmarker versehen.

In der Literatur wurde vielfach Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) mit Polysacchariden zum entsprechenden Thiocarbamat umgesetzt, um ein fluoreszenzmarkiertes PS zu erhalten.^[261,262] Es zeigte sich, dass sich Polygalacturonsäure in Formamid, bei RT und 80 °C mit FITC zum entsprechenden Thiocarbamat umsetzen lässt (Abbildung 41). Es konnten Fluoresceinthiocarbamate der Polygalacturonsäure synthetisiert werden. Der Massenanteil an polysaccharidgebundenem Farbstoff variiert hierbei zwischen 0,04 m% bis hin zu 1,50 m% (Abbildung 43). Die Parameter der Substitution wurden so gewählt, dass eine eindeutige Markierung die Identifizierung des Polysaccharids mittels Fluoreszenzspektroskopie erlaubt, dabei jedoch die Eigenschaften der Gelbildung nicht beeinflusst werden.

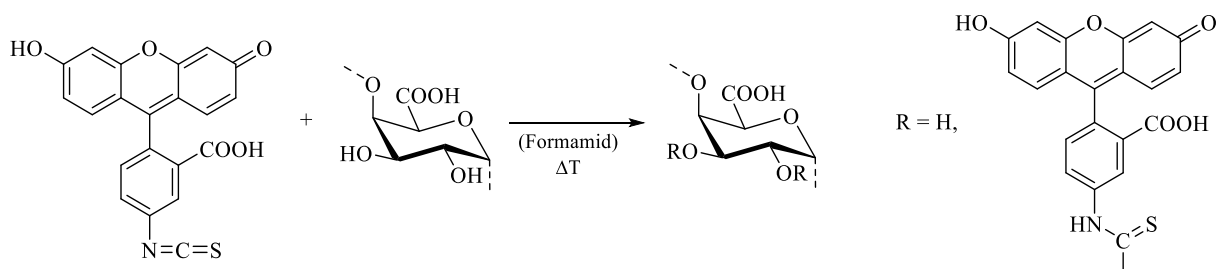


Abbildung 41: Syntheschema zur Anbindung von Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) an Polygalacturonsäure (PGaIS) bei RT und 80 °C in Formamid.

Zur Reinigung der Produkte, wurde das Material in deionisiertem Wasser gelöst und dialysiert, bis das Dialysewasser keine Fluoreszenzemission des nicht angebondenen Farbstoffes zeigte. Im Anschluss erfolgt eine Gefriertrocknung der Proben. Die Bestimmung der Massenprozentage an polymergebundenem Farbstoff in den gereinigten Proben erfolgte über UV-Vis-Messungen. Hierfür wurde eine Kalibriergerade mit Fluorescein in Wasser bei einem pH-Wert von 9,0 angefertigt und das Absorptionsmaximum bei λ_{max} : 494 nm gegen die Konzentration aufgetragen (Abbildung 42).

3 Spezieller Teil

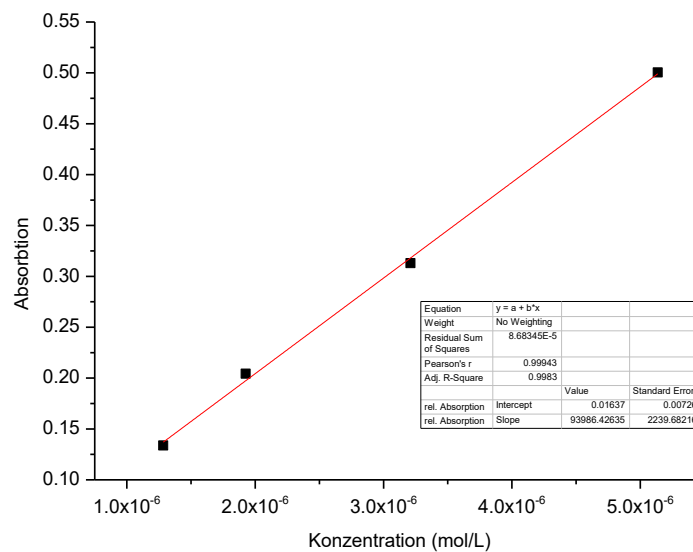


Abbildung 42: Kalibriergerade von Fluoresceinisoithiocyanat ermittelt bei einer Wellenlänge von $\lambda_{max} = 494 \text{ nm}$ in Wasser bei pH 9,0.

Die Massenprozent an polymergebundenem Farbstoff sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für die Fluoreszenzmarkierung von Polygalacturonsäure in Formamid, bei 18 h Reaktionszeit.

Reaktionsbedingungen		Produkt	
Moläquivalente FITC Äquiv.	Temperatur [°C]	Probe	m%
0,03	80	F1	1,17
0,03	RT	F2	0,04
0,06	80	F3	1,50
0,06	RT	F4	0,11

m% = Massenprozent an gebundenem Farbstoff; FITC = Fluoresceinisoithiocyanat "Isomer I"

Die gebundene Farbstoffmenge variiert je nach Reaktionstemperatur und eingesetzter Farbstoffmenge. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 80°C ergibt, wie zu erwarten, einen höheren Grad an gebundenem Farbstoff.

Die fluoreszenzmarkierte PGaIS wurde aus einer wässrigen Lösung, zusammen mit einer Polymerdispersion, auf ihr Abscheideverhalten hin untersucht. Als Polymerdispersionen wurden eine Polyurethan- (PUD) und eine Epoxi-Phenoldispersion (EPD), wie in der technischen Anwendung typischerweise verwendet, betrachtet.

3 Spezieller Teil

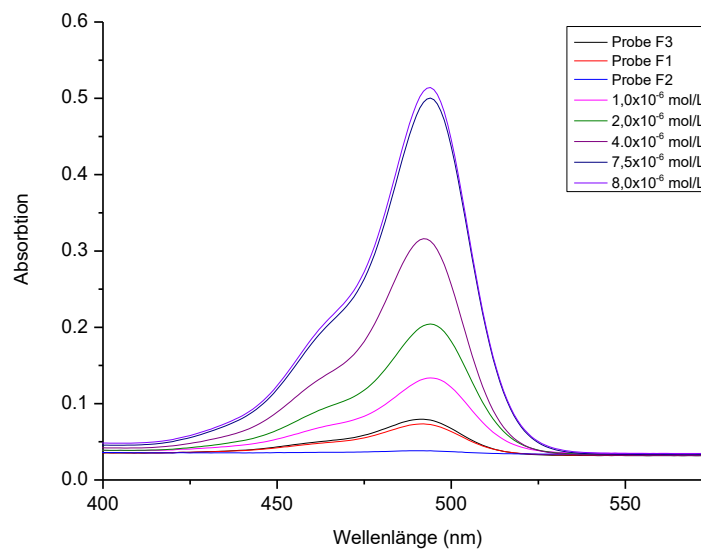


Abbildung 43: UV-Vis-Spektren von Fluoreszein in Wasser mit den zuvor ermittelten Standards I – V (von $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L bis $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L) und den markierten Fluoresceinthiocarbamaten der Polygalacturonsäure mit unbekannter Konzentration.

Die Mischung aus markierter PGaIS und Polymerdispersion wurde auf einer Metalloberfläche (kaltgewalzter Stahl) abgeschieden (Abbildung 44) und die erhaltenen Strukturen untersucht. Hierfür wurde das Metall in das wässrige Polymergemisch getaucht (1. in Abbildung 44) und nach 30 Sekunden wieder entfernt. Bei einem Versuch wurden die Proben nach der Behandlung mit fließendem Wasser abgespült, um nicht anhaftendes Material zu entfernen (2.b). Bei einem weiteren Versuch unterblieb dieser Spülvorgang, um einen möglichst vollständigen Gradienten des Polymerfilms zu erhalten (2.a). Die Proben wurden nach der jeweiligen Behandlung direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren (3.) und anschließend gefriergetrocknet. Die Proben wurden nach der jeweiligen Behandlung direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren (3.) und anschließend gefriergetrocknet.

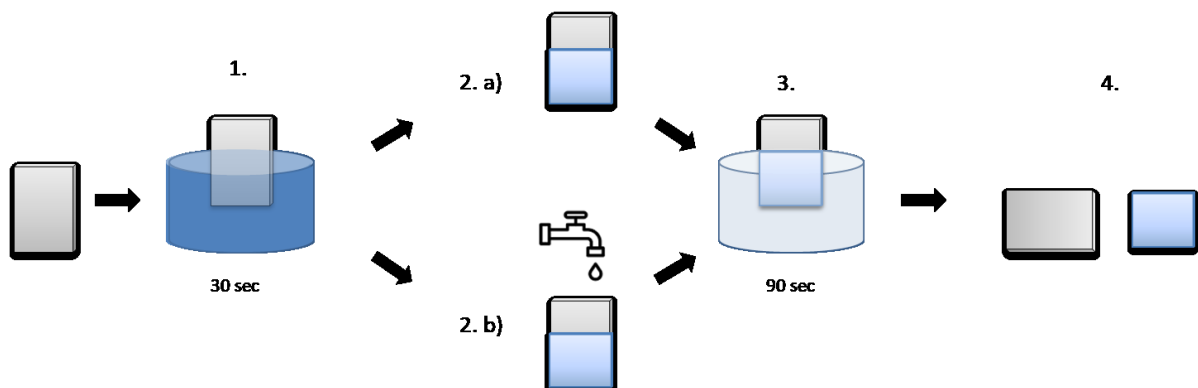


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Polysaccharidfilmherstellung. Das Metall wird in die Polymerlösung getaucht (1.), anschließend ohne (2.a) und mit Spülvorgang (2.b) in flüssigem Stickstoff schockgefroren (3.) und gefriergetrocknet. Danach wurde der getrocknete Film abgelöst (4.) und untersucht.

3 Spezieller Teil

Diese Methode stellt, für die zu untersuchende Fragestellung, die schonendste Variante dar. Die Gefriertrocknung stellt hierbei sicher, dass das entstandene Polysaccharidnetzwerk nicht, wie bei einer konventionellen Vakuumtrocknung, kollabiert. Somit wird der gebildete Polysaccharidgradient nicht zerstört und kann im Anschluss mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie detailliert untersucht werden. Als Kontrolle wurden die gleichen Abscheideversuche an Glasoberflächen unter analogen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde allerdings der Spülvorgang ausgesetzt, da es zu keiner ionischen Gelbildung auf der Glasoberfläche kommt und somit keine Haftung, bzw. Spülresistenz gegeben war.

Die nach dem Spülen gefriergetrockneten Proben zeigten eine Polymerschichtdicke auf dem Metall von 15 μm – 35 μm . Die Modellvorstellung soll durch Abbildung 45 verdeutlicht werden. Gelangt das Metall mit der sauren, wässrigen Pektinlösung in Kontakt, werden Ionen aus der Metalloberfläche herausgelöst und führen zu einer ionischen Gelierung des Pektins an der Metalloberfläche. Dieser Effekt nimmt mit zunehmendem Abstand vom Metall ab, da der Diffusionsweg der freigesetzten Metallionen zum Pektin größer wird und die Viskosität im Gel stark erhöht ist. Durch diese Zusammenhänge sollte sich ein Pektingradient, wie in Abbildung 45 gezeigt, ergeben, der bisher nicht analytisch bewiesen werden konnte.

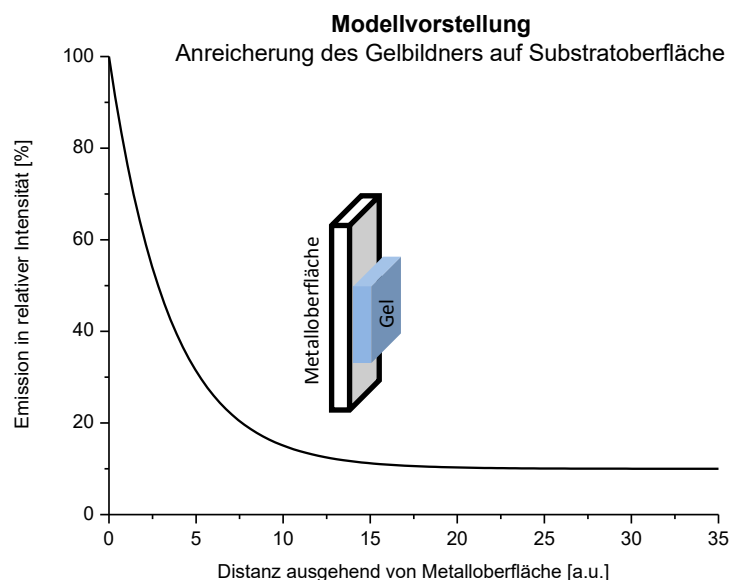


Abbildung 45: Modellvorstellung zur Ausbildung eines Pektingradienten beim Abscheiden auf einer Metalloberfläche

In Abbildung 46 sind die Emissionswerte der konfokalen Fluoreszenzmessungen nach der Abscheidung von PGaIS mit PUD auf Stahl und Glas gezeigt. Die Eindringtiefe der einzelnen

3 Spezieller Teil

Messungen beträgt $3\text{ }\mu\text{m}$ je Aufnahmepunkt, so wurde die gesamte Gelschicht mit 5 Aufnahmen vollständig abgerastert. Die Intensität wurde für die erste Messung willkürlich auf 100 % gesetzt. Aufgrund der Oberflächenrauigkeit des Metallsubstrates wurde die erste Messung nicht exakt bei $x = 0\text{ }\mu\text{m}$ gestartet. Die Abscheideversuche auf dem Glassubstrat zeigen keine Intensitätsänderungen zwischen den einzelnen, abgerasterten Schichten. Somit ist eine Anreicherung von PGaIS an der Glasoberfläche nicht wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu zeigt die Intensitätskurve für die Abscheidung auf der Metalloberfläche eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität. In der unmittelbaren Umgebung des Metalls hin zum Ende des Gelfilms fällt das Fluoreszenzsignal auf 25 % seiner ursprünglichen Intensität ab. Dieser Befund ist ein Hinweis für einen Gradienten bei der Verteilung des Pektins. Der Gradient bildet sich auch in Gegenwart der Polyurethandispersion in der wässrigen Lösung aus.

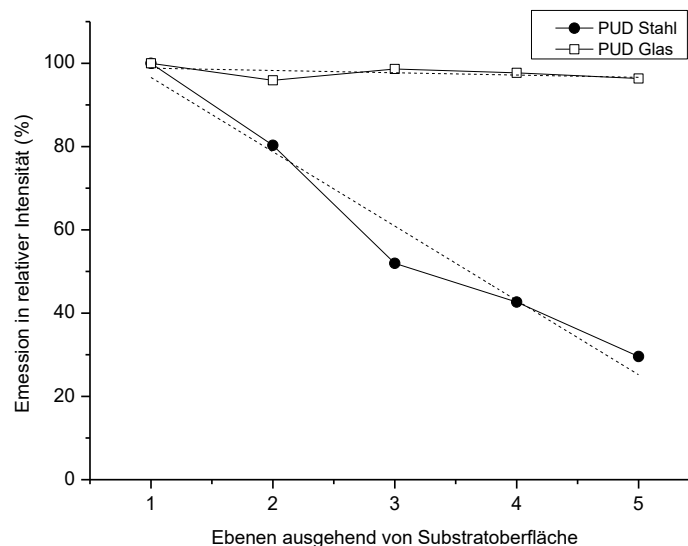


Abbildung 46: Emissionswerte der konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen einer Polyurethan-Polygalacturonsäure Dispersion (PUD) abgeschieden auf Glas und Stahl-Substrat (CRS).

In Abbildung 47 ist das Abscheideverhalten einer wässrigen PGaIS-EP-Dispersion auf Glas und einem Metallsubstrat dargestellt. Die Ergebnisse der konfokalen Fluoreszenzmikroskopiemessungen sind mit den vorhergehenden vergleichbar, wobei hier Schnitttiefen von je $2\text{ }\mu\text{m}$ vorgenommen und die gesamte Schicht in 8 Schnitten abgerastert wurde. Die PGaIS zeigt keine Gradientenbildung bei der Ablagerung auf dem Glassubstrat, wohingegen eine klare Fluoreszenzintensitätsabnahme bei der Abscheidung auf dem Metallsubstrat erkennbar ist. Diese Messungen bestätigen eindeutig die Modellvorstellung,

3 Spezieller Teil

dass die Gelbildung ausgehend vom Metallsubstrat einen PGaIS-Konzentrationsgradienten weg von der Metalloberfläche ausbildet. Die in Abbildung 46 und Abbildung 47 gezeigten Kurven der Dispersion auf Stahl zeigen die Intensitätsabnahme weg von der Metalloberfläche, welche die Abscheidung auf einem Metallsubstrat mit anschließendem Abspülen von überschüssigem Material darstellen. Dieser Versuchsaufbau spiegelt den Anwendungsprozess am ehesten wider. Wie bereits weiter oben im Kapitel erwähnt, wurden ebenfalls Abscheideversuche auf Metallsubstraten ohne einen abschließenden Spülvorgang durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 48 anhand der konfokalen Fluoreszenzmessungen eines Abscheideversuches einer PGaIS-EP-Dispersion auf einem Metallsubstrat festgehalten.

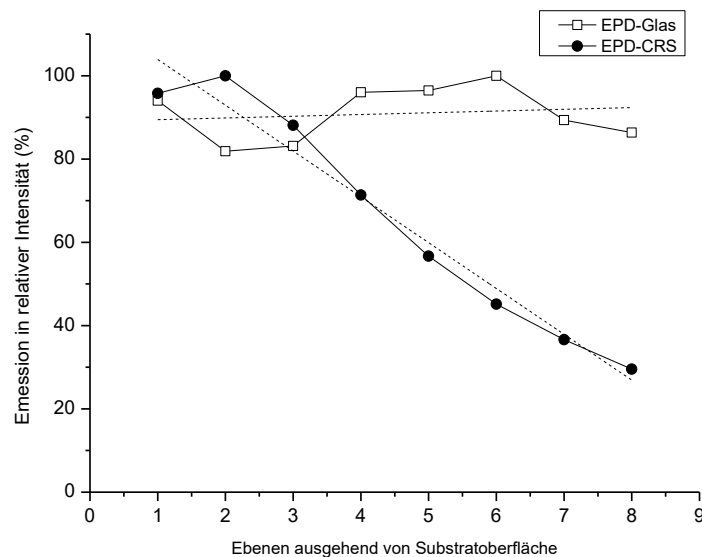


Abbildung 47: Emissionswerte der konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen einer Epoxi-Phenol-Polygalacturonsäure Dispersion (EPD) abgeschieden auf Glas und Stahl-Substrat (CRS).

Der Kurvenverlauf der abnehmenden Gelschicht ist vergleichbar mit dem in Abbildung 46 und Abbildung 47 dargestellt. Im Unterschied zu den ersten Versuchen ist der hier untersuchte Gelfilm dicker (ca. 30 μm). Die analysierten Einzelschichten haben jeweils eine Stärke von 2 μm , daraus ergeben sich 15 untersuchte Einzelschichten. Der experimentelle Abfall der PGaIS-Konzentration weg vom Metallsubstrat zeigt sich deutlicher bei den nicht gespülten Proben.

Die Ausbildung eines PGaIS- oder Pektingradienten lässt sich mit diesen neuen Untersuchungen sehr elegant bestätigen und passt zu der in den 1950er Jahren aufgestellten Theorie der Ionenvaleanzgele von niederveresterten Pektinen und deren Verdichtung mit

3 Spezieller Teil

mehrwertigen Metallionen, welche von *Thiele und Anderson* (1955) sowie *Henglein* (1958) eingeführt worden ist.^[235,263]

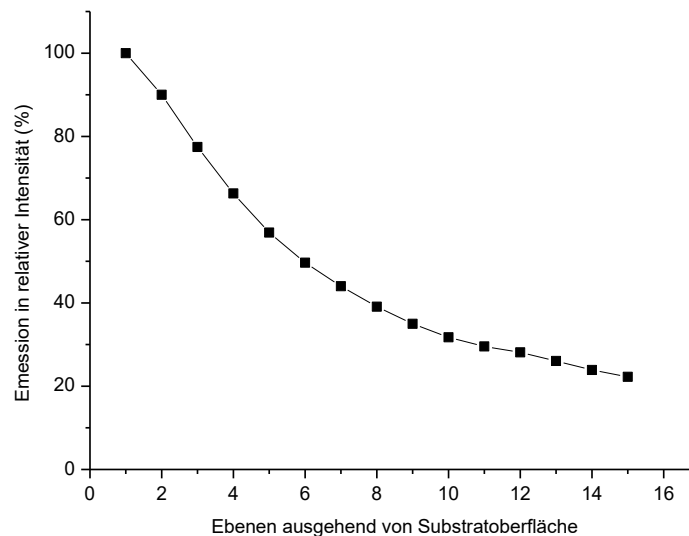


Abbildung 48: Emissionswerte der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie einer Epoxi-Phenol-Dispersion (EPD) und PGals auf Stahl-Substrat (CRS) ohne anschließenden Spülvorgang.

Alternativ zur kovalenten Anbindung sollte ein Fluoreszenzfarbstoff ionisch durch Wechselwirkung mit den Carboxylatgruppen der PGals eingeführt werden (Abbildung 49). Als kationisch geladener Farbstoff bot sich das Berberinchlorid an, ein Naturstoff, der aus dem Schöllkraut oder der Berberitze isoliert werden kann und kommerziell erhältlich ist. Für die Umsetzung wurde Natriumpolygalacturonat in Wasser gelöst mit einem Überschuss des wasserlöslichen Berberinchlorids versetzt. Das Gemisch wurde gerührt und im Anschluss in Isopropanol ausgefällt und gewaschen. Schließlich erfolgte die Trocknung des Materials.

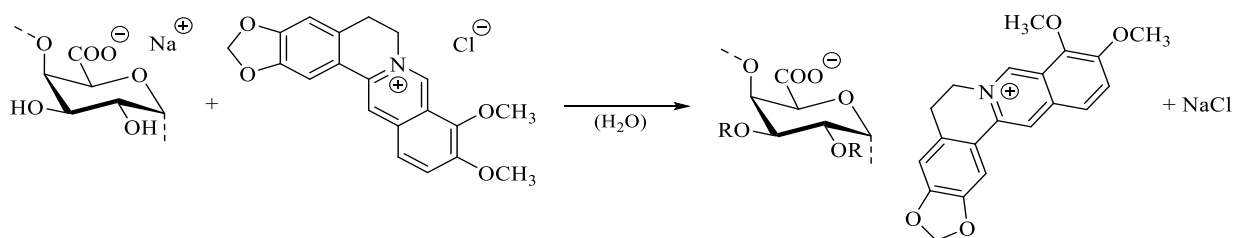


Abbildung 49: Herstellung von mit Berberinchlorid markierten Natrium-Polygalacturonat (Na-PGal).

Der Gehalt an Berberin wurde mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. Das Absorptionsmaximum bei λ_{max} 357 nm wurde für die Kalibriergerade herangezogen (experimenteller Teil). Die erreichten Massenprozent (m%) des angelagerten Berberins lagen

3 Spezieller Teil

bei 36,1 m% und 57,2 m%. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Teil an Carboxygruppen durch diese Umsalzung mit dem ionischen Farbstoff beladen werden konnten. Für die Abscheidungsversuche waren diese Umsetzungsgrade viel zu hoch bemessen, sodass Derivate mit einem signifikant kleineren Massenprozentanteil analog synthetisiert wurden (Tabelle 6).

Tabelle 6: *Reaktionsübersicht und Ausbeuten der ionischen Anbindung von Berberinchlorid bei Raumtemperatur.*

Reaktionsbedingungen		Produkt		Dialysiert
Mol-Verhältnis AGaE / BerbCl	BerbCl gelöst in	Probe	m%	m%
1 / 0,018	MeOH	B1	57,2	2,86
1 / 0,018	H ₂ O	B2	36,1	2,16

MeOH = Methanol, H₂O = Wasser

Analog den FITC-Derivaten der PGaIS sollte mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, ob man den PGaIS-Gradienten bei der Abscheidung mit Hilfe der ionisch markierten PGaIS sichtbar machen kann. Aufgrund des ionischen Charakters zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Messungen kein vergleichbares Bild. Der Ionenaustausch des Farbstoffs gegen Metall sorgte für ein rasches Abdiffundieren des Fluoreszenzfarbstoffes von dem PGaIS-Gerüst während der Metall-Komplexierung. Dadurch konnten keine Zusammenhänge zwischen einem Konzentrationsgradienten und dem Auftreten eines Fluoreszenzsignals identifiziert werden.

Nach den positiven Ergebnissen bei der Bildung von Fluoreszeinthiocarbamaten der PGaIS sollte diese Reaktion weiter untersucht werden. Die Idee, ein reaktives Isothiocyanat an PGaIS anzubinden, um damit die Hydrophobie des Polysaccharids zu erhöhen, ohne die Abscheideeigenschaften zu verschlechtern, sollte näher untersucht werden. Um die Charakterisierung der Produkte zu vereinfachen, wurde das aromatische Phenylisothiocyanat als Reaktionspartner ausgewählt (Abbildung 50). Gegenüber dem Polygalacturonsäurerückgrat zeigt der Phenylsubstituent gut isolierte Signale im NMR-Spektrum und lässt sich UV-Vis-spektroskopisch gut analysieren.

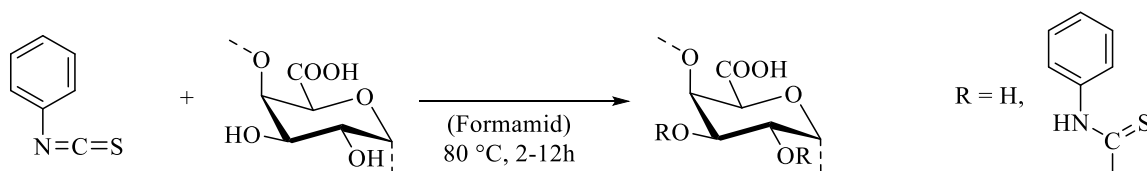


Abbildung 50: Syntheschema zur Anbindung von Phenylisothiocyanat an PGaIS bei 80°C in Formamid.

Die Umsetzungen von Phenylisothiocyanat erfolgten in Formamid mit PGaIS bei 80 °C für 2 bis 12 Stunden. Es wurden steigende Moläquivalente (0,5 Äquivalenten – 6,0 Äquivalenten) an Reagenz eingesetzt, jedoch blieb auch beim Einsatz eines großen Überschusses an Phenylisothiocyanat der erreichte DS gering. Für eine Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff ist ein Isothiocyanat reaktiv genug, jedoch ist der durchschnittliche Substitutionsgrad mit Phenylisothiocyanat und dieser Synthesemethode sehr gering (Tabelle 6). Die synthetisierten Derivate wurden trotz des geringen DS bezüglich der Gelbildungs- und Abscheideeigenschaften gegenüber Metalloberflächen untersucht. Es zeigte sich, dass die Thiocarbamatderivate eine generell verminderte Gelierung aufweisen. Darüber hinaus sind die gebildeten Gelfilme nicht spülfest, wodurch die synthetisierten Produkte nicht den geforderten Ansprüchen für eine technische Anwendung genügen.

3.3 Silylierung von Polygalacturonsäure

Durch die Derivatisierung von Pektin mit Silylreagenzien sollten hydrophobe, aber noch gelbildende Produkte gewonnen werden. Die Silylierung wurde unter drei Gesichtspunkten untersucht. Zunächst sollte die Möglichkeit der Hydrophobierung des Polysaccharids betrachtet werden, als zweites war eine verbesserte Löslichkeit in dipolar aprotischen Lösungsmitteln von Interesse und als dritter Punkt sollten die eingeführten Silylgruppen den Korrosionsschutz in der späteren Anwendung positiv beeinflussen.

Die Silylierungsreaktionen ionischer Polysaccharide wurden im Vergleich zu denen mit Cellulose nur wenig untersucht. Zur Synthese von Silylderivaten des Pektins wurden Tetrachlorsilan, Alkyl- und Arylsilanen in Kombination mit Formamid/Pyridin als Reaktionsmedium eingesetzt.^[202] Bei der Umsetzung von TMSCl mit Pyridin konnten TMS-Pektine mit einem maximalen DS von 0,9 erhalten werden. Trimethylsilylderivate von Pektin wurden auch mit Hexamethyldisilazan (HMDS) in Formamid hergestellt.^[203] Die erhaltenen

3 Spezieller Teil

DS-Werte waren im Vergleich zu den mit TMSCl erzielten viel höher (DS von 1,8). Leider werden die Eigenschaften der erhaltenen Produkte nicht ausreichend beschrieben, um die Produkte genauer miteinander vergleichen zu können. Die Autoren zeigten keine Daten, die ihren Strukturanspruch stützen, sie führten lediglich die IR-Signale für die in den Produkten gefundene Silylgruppe an, ohne ein vollständiges IR-Spektrum der erhaltenen Produkte. Einerseits ist PGaIS in fast allen organischen Lösungsmitteln unlöslich, außer in Formamid, das mit starken Elektrophilen zu Nebenreaktionen neigt. Eine effiziente Derivatisierung unter homogenen Reaktionsbedingungen ist daher schwer zu erreichen. Andererseits können die Hydroxygruppen an den Positionen 2 und 3 in der Wiederholungseinheit auch als Nukleophil wirken und bei einer Aktivierung der Carbonsäuregruppe des Polysaccharids reagieren, was zum Vernetzen und damit zu unlöslichen Produkten führt.^[205] Um die Hydroxygruppen zu schützen und gleichzeitig die Löslichkeit des Polymers zu erhöhen, wurde die Trimethylsilylierung von PGaIS untersucht.

Hierfür wurden zwei Silylierungsreagenzien miteinander verglichen (Abbildung 51).

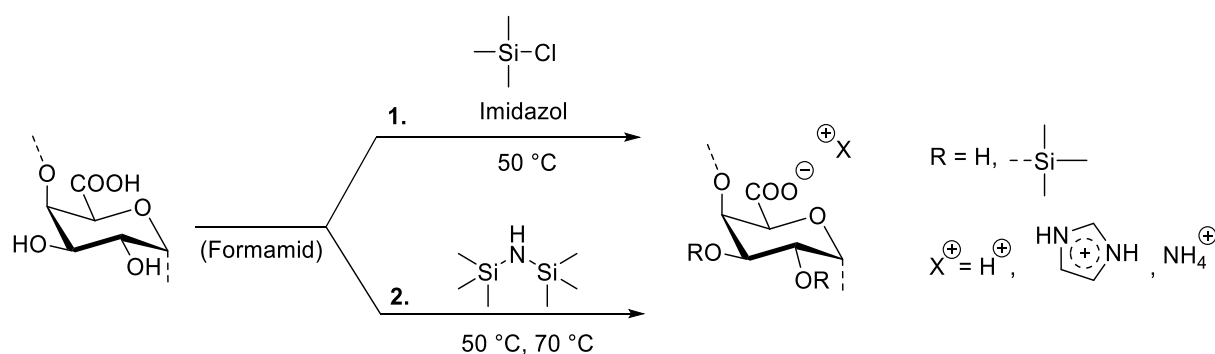


Abbildung 51: Silylierung von in Formamid gelöster Polygalacturonsäure (PGaIS) mit 1) Trimethylsilylchlorid/Imidazol und 2) 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan bei erhöhten Temperaturen.

In einer Versuchsreihe zur Silylierung von PGaIS wurde Trimethylsilylchlorid (TMSCl) als Reagenz und Imidazol als Base und Katalysator verwendet. Die Reaktionstemperatur betrug 50 °C und die TMSCl Menge wurden von 3,0 bis 6,0 Äquivalenten variiert (bezogen auf die Anhydrogalacturonsäure-Einheit, AGaIE). Die Base wurde in hohem Überschuss (4,0 Äquivalente bis 8,0 Äquivalente) eingesetzt, um die begleitende Salzbildung mit der Carbonsäurefunktion der PGaIS zu kompensieren. Imidazol wurde als Base gewählt, da es mit TMSCl zu einem stark elektrophilen TMS-Imidazolium reagieren kann.^[264,265] Zusätzlich führt die Hydrochloridform der Base nicht zu Nebenreaktionen mit Formamid, wie sie für

3 Spezieller Teil

Pyridin in der Vergangenheit beschrieben worden sind.^[202] Nach *Henglein und Scheinost* führt die Umsetzung von Pyridinhydrochlorid in Formamid zur Bildung von NH_4Cl .^[202] Der erreichte DS-Wert der Silylierung mit TMSCl beträgt 0,6 (Tabelle 7). Diese Ergebnisse zeigen einen kleineren Umsetzungsgrad als er in früheren Arbeiten erreicht werden konnte. Dort wurden Trimethylsilylpektine mit einem DS von 0,9 synthetisiert.^[202] Die Diskrepanz ist ein Hinweis auf eine mögliche Seitenkettensilylierung der *L*-Rhamnose-Einheiten in dem zuvor untersuchten Pektin, welche bei PGaIS aufgrund des Herstellungsprozesses nicht auftreten kann. Bei der PGaIS-Herstellung wird ein enzymatischer Reinigungsschritt eingesetzt, bei dem die Seitenketten aus dem Pektingerüst entfernt werden und fast reine PGaIS zurückbleibt. Somit sind keine Seitenketten für eine zusätzliche Silylierung vorhanden. Darüber hinaus wurde in der Literatur nicht die Änderung des Molekulargewichts des Materials berücksichtigt, wenn sich die Polygalacturonat-Einheiten während der Reaktion in die Pyridiniumsalzform umwandeln.

Als weiteres Silylierungsreagenz wurde 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS) untersucht. Durch die Verwendung von HMDS, jeweils mit einer katalytischen Menge TMSCl zur Aktivierung, konnte die Reaktionstemperatur von 50 °C auf 70 °C erhöht werden. Die Reagenzmenge wurde von 1,5 bis 12,0 Äquivalente variiert, dabei immer bezogen auf eine reaktive Silylierungseinheit. Es konnten Produkte mit einem DS von bis zu 1,8 erhalten werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von *Harmon et al.* gut überein.^[203] HMDS liefert somit ein signifikant höher substituiertes TMS-PGaI, jedoch war auch keine vollständige Silylierung von PGaIS möglich (Tabelle 7).

Die resultierenden farblosen Materialien sind in Wasser löslich, was mit der Bildung der Imidazolium- bzw. Ammoniumsalzform der PGaIS während der Reaktion erklärt werden kann. Im Gegensatz dazu wurde in früheren Arbeiten beschrieben, dass TMS-Pektin in Wasser unlöslich sei.^[202]

Die beschriebene Salzbildung ist in den NMR- und IR-Spektren der Proben deutlich zu erkennen. Die Verwendung von TMSCl führt zu einem geringeren Ausmaß der Salzbildung im Vergleich zum HMDS. Dies kann durch eine kleine Gleichgewichtskonstante zwischen der schwachen Säure (PGaIS), der schwachen Base (Imidazol) und ihrer resultierenden Salzform erklärt werden. Die pK_a - bzw. pK_b -Werte für Galacturonsäure ($\text{pK}_a = 3.48$) und Imidazol ($\text{pK}_b = 7.00$) belegen diese Tatsache.^[266,267]

3 Spezieller Teil

Tabelle 7: Reaktionsparameter und Produkte der Silylierung von Polygalacturonsäure (PGaIS) in Formamid unter Verwendung von Trimethylsilylchlorid (TMSCl) oder 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS).

Reaktionsparameter					Produkt	
Reagenz	Imidazol [Äquiv.]	Reagenz [Äquiv.]	Zeit [h]	Temp. [°C]	Nr.	DS ¹
TMSCl	3,0	2,0	2	50	Si 1	0,2
TMSCl	4,0	3,0	2	50	Si 2	0,4
TMSCl	8,0	6,0	2	50	Si 3	0,6
TMSCl	8,0	6,0	12	50	Si 4	0,6
HMDS	-	1,5	2	50	Si 5	0,1
HMDS	-	3,0	2	50	Si 6	0,5
HMDS	-	6,0	2	50	Si 7	0,9
HMDS	-	6,0	2	70	Si 8	1,1
HMDS	-	8,0	2	70	Si 9	1,2
HMDS	-	10,0	2	70	Si 10	1,5
HMDS	-	12,0	12	70	Si 11	1,8

¹DS – Substitutionsgrad berechnet aus ¹H NMR Daten.

Bei den mit HMDS erhaltenen Produkten tritt eine nahezu vollständige Salzbildung auf wie aus dem IR-Spektrum hervorgeht (Abbildung 57). Der Grund ist eine andere Säure-/Basestärke für die Salzbildung von PGaIS und Ammoniak, welcher während der Reaktion freigesetzt wird.

Die wässrigen Lösungen der trimethylsilylierten Polygalacturonate sind nicht hydrolysestabil, es tritt eine Spaltung der Trimethylsilylreste auf, die zu einer Bildung von Trimethylsilanol führt. Die Freisetzung von Trimethylsilanol für TMS-Pektine ist bereits in der Literatur beschrieben worden.^[202] Es wurde festgestellt, dass die vollständige Hydrolyse von TMS-Pektin in siedendem Wasser innerhalb von fünf Minuten erfolgt. Im Vergleich zu anderen Trimethylsilyl-PS konnte die Löslichkeit von PGaIS gegenüber organischen Lösungsmitteln durch Einführung des TMS-Substituenten nicht verbessert werden. Die synthetisierten TMS-PGaIS-Proben lösen sich nicht in Dimethylsulfoxid (DMSO), *N,N*-Dimethylformamid (DMF),

3 Spezieller Teil

N,N-Dimethylacetamid (DMAc), Ethylacetat, Tetrahydrofuran oder Chloroform, was vermutlich aus der ionischen Natur der Produkte resultiert.

Allerdings lösen sie sich in Wasser und daher konnten NMR-Spektren von TMS-PGal in Deuteriumoxid aufgenommen werden (Abbildung 52 und Abbildung 55). Die mit HMDS erhaltene TMS-PGal ergibt ein Protonen-NMR-Spektrum mit einem Signal bei 0,22 ppm, welches der Trimethylsilyl-Einheit zugeordnet werden kann (Abbildung 52). Die Signale der AGalE sind in Übereinstimmung mit der Literatur bei 4,09 ppm, 4,31 ppm, 5,13 ppm und 5,42 ppm zu finden, die den Protonen an Position 2, 3, 4 und 1 zugeordnet werden können.^[78] Das fehlende Signal für das Proton an C5 ist mit dem Deuteriumoxid-Signal überlagert, es ist jedoch im 2D-HSQC-NMR-Spektrum sichtbar (Abbildung 53). Zwei Signale bei 8,04 ppm und 8,58 ppm können der Ammoniumform von PGalS, die während der Reaktion gebildet wird, und einer Amidgruppe zugeordnet werden, die in einer Nebenreaktion entsteht.^[268] Leider können diese beiden Signale aufgrund des schnellen H-D-Austauschs in Deuteriumoxid nicht deutlicher aufgelöst werden.

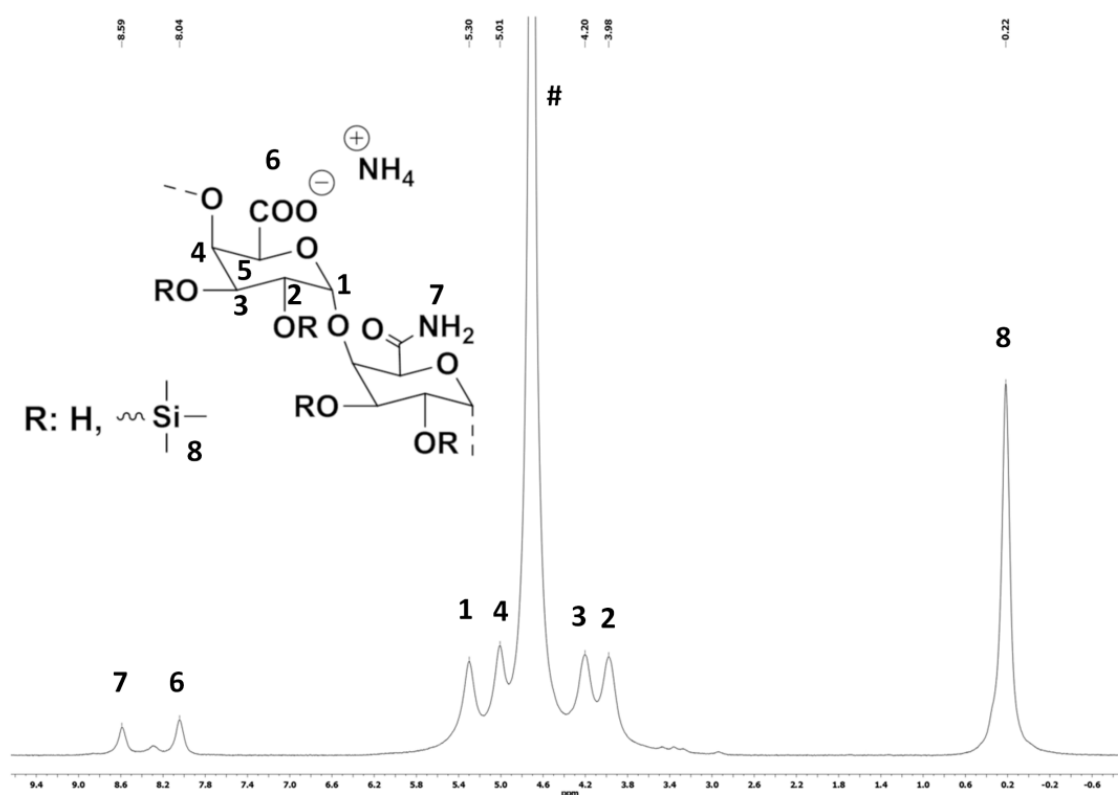


Abbildung 52: ¹H-NMR-Spektrum von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal), erhalten durch die Umsetzung mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS), gemessen in #D₂O.

3 Spezieller Teil

In dem ^1H -NMR-Spektrum von TMS-PGal, das mit TMSCl erhalten wurde, sind zwei Signale bei 0,36 ppm und bei 0,49 ppm für die Trimethylsilylgruppen erkennbar (Abbildung 55). Hierfür verantwortlich ist die Hydrolyse von Silylgruppen, die an das Polymergrundgerüst gebunden sind und in wässriger Lösung Trimethylsilanol bilden.

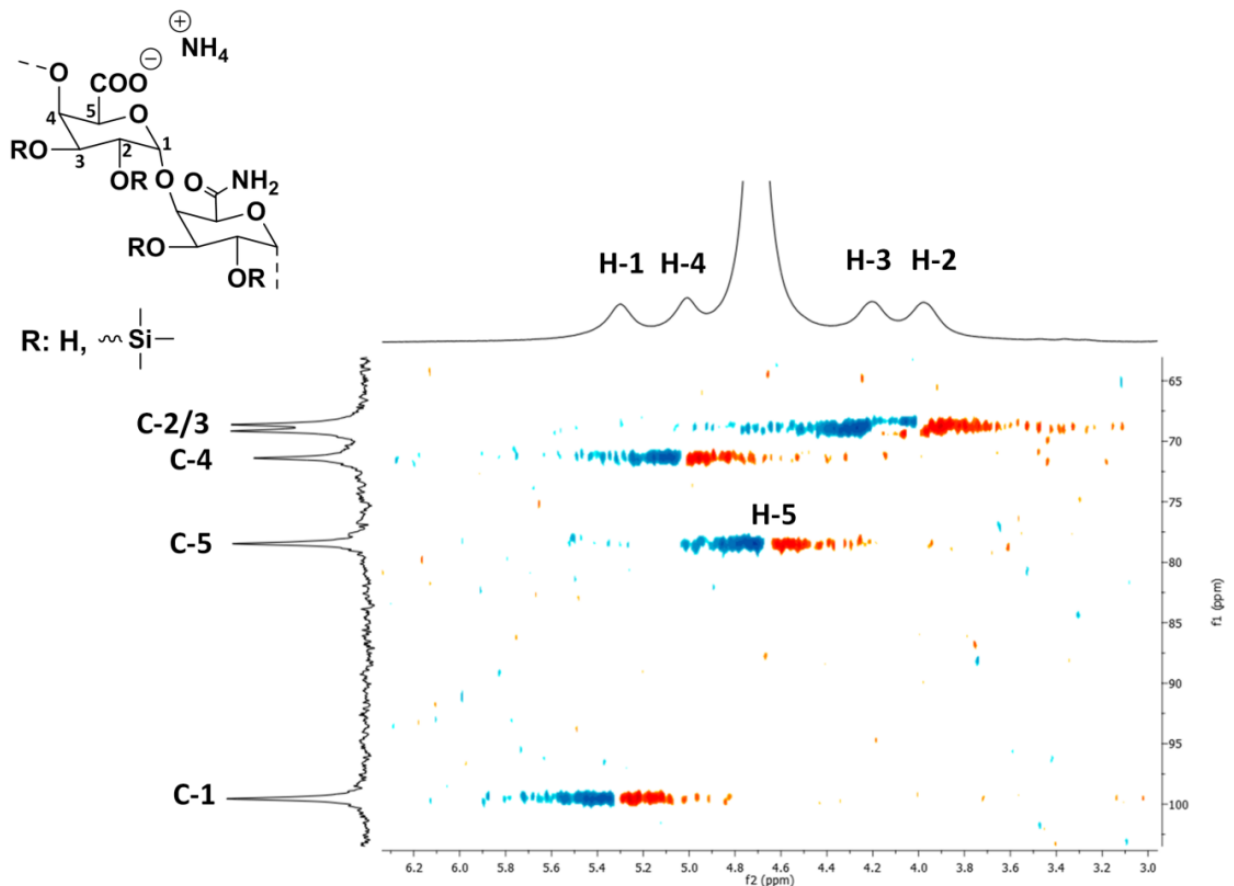


Abbildung 53: Teil eines HSQC-NMR-Spektrums von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal, **Si 9**), gemessen in D_2O . Der Teil der Polysaccharid-Wiederholungseinheit ist gezeigt. Das Signal des an Kohlenstoff C5 befindlichen Protons wird mit dem Lösungsmittelsignal überlagert.

Die Hydrolyseprodukte konnten im Diffusions-NMR-Spektrum von TMS-PGal in D_2O gut beobachtet werden (Abbildung 54). Das Spektrum zeigt, dass alle Signale der AGaIE (5,5 ppm - 4,0 ppm) mit dem verknüpften TMS-Rest bei 0,22 ppm vergleichbare Diffusionskoeffizienten aufweisen. Ein zweites Signal bei 0,49 ppm ist sichtbar, welches einen deutlichen Unterschied in der Translationsgeschwindigkeit im Vergleich zum Polymergerüst aufweist. Dieses Signal wird dem Hydrolyseprodukt Trimethylsilanol zugeordnet.

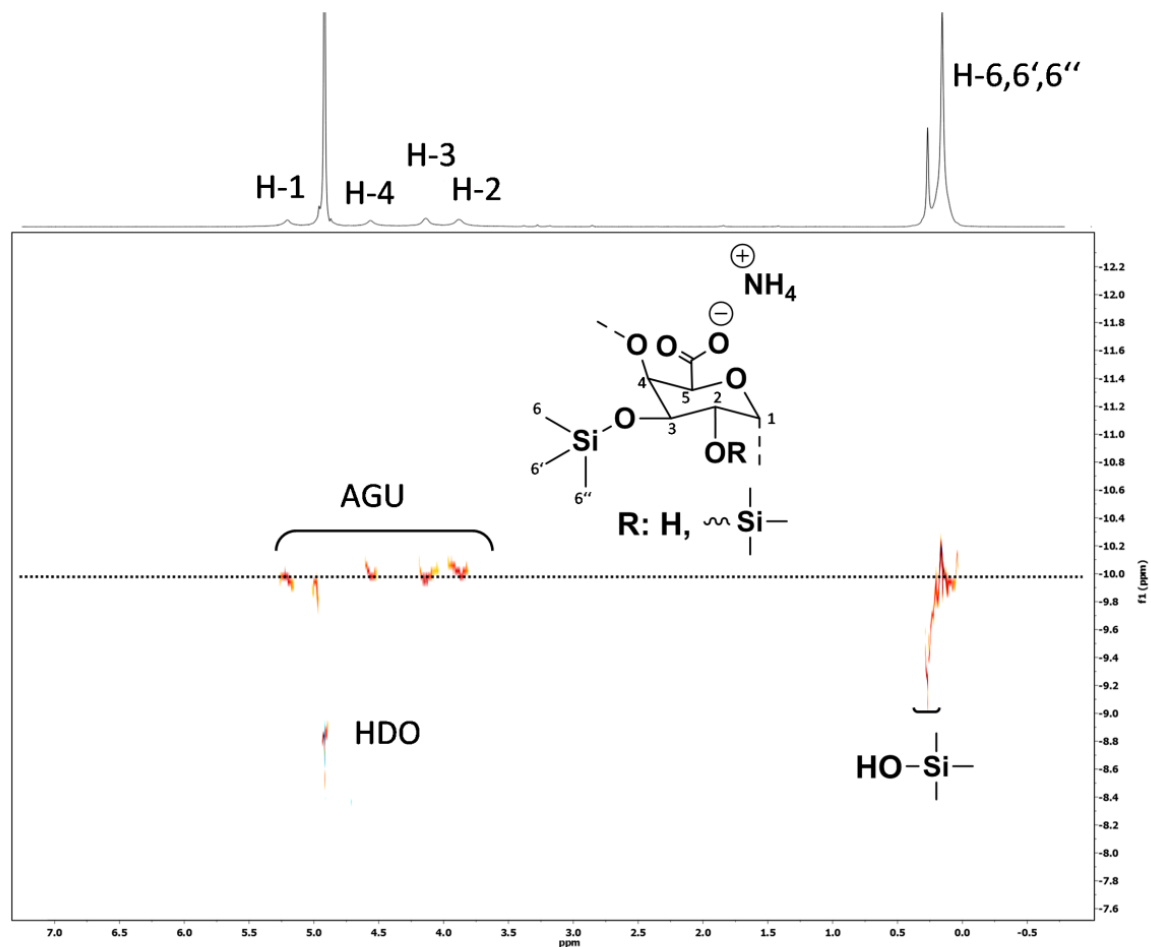


Abbildung 54: Diffusions-NMR-Spektrum von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal, **Si 10**) in Deuteriumoxid. Die Hydrolyse im Lösungsmittel führt zur Bildung von Trimethylsilylalkohol, der eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit als die an das Polymergerüst gebundenen Trimethylsilylgruppen zeigt (gestrichelte Linie).

Im ^1H -NMR Spektrum des TMS-PGal, erhalten aus der Umsetzung von PGalS mit TMSCl/Imidazol, sind neben den Signalen, die der Wiederholungseinheit entsprechen (4,12; 4,34; 5,23 und 5,44 ppm), zwei zusätzliche Signale (7,77; 8,96 ppm) erkennbar. Diese können den an der anionischen Carboxylatgruppe angelagerten Imidazoliumkationen zugeordnet werden.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von TMS-PGal von der Umsetzung mit HMDS zeigt Signale bei 0,3 ppm und 1,4 ppm, die den verknüpften und hydrolytisch gespaltenen TMS-Gruppen zugeordnet werden können (Abbildung 56). Aufgrund der langen Zeit für die ^{13}C -NMR-Messung ist die Hydrolyse in diesem Fall nahezu abgeschlossen.

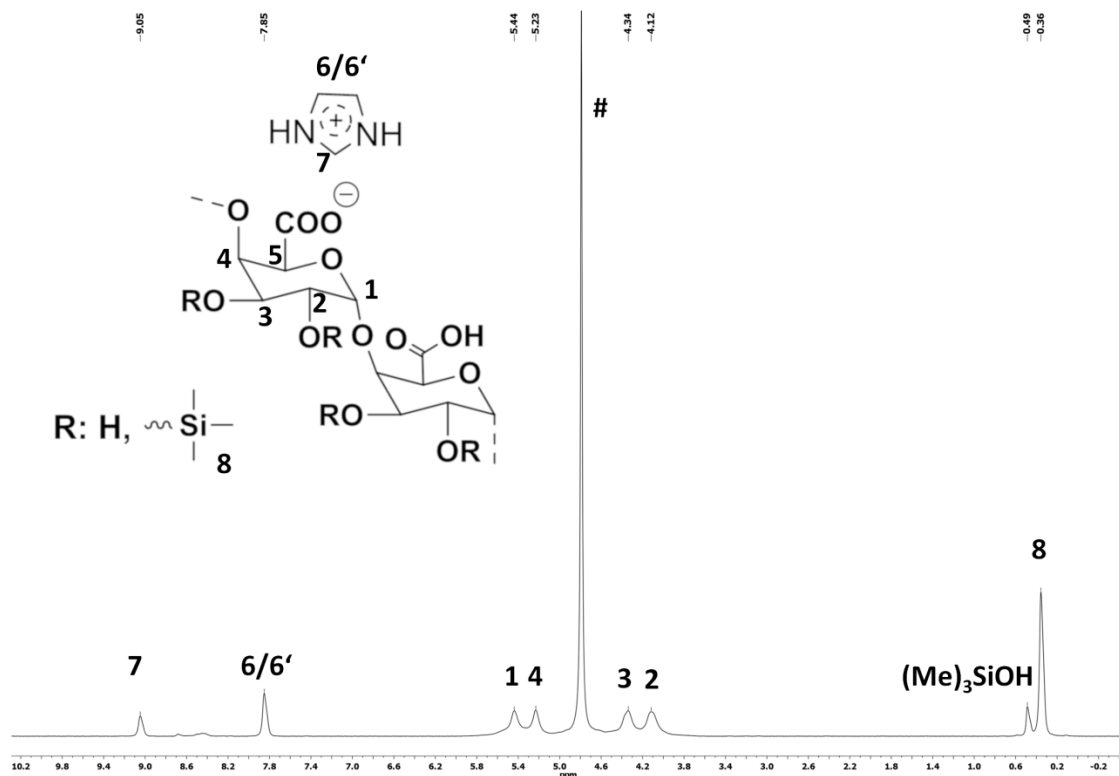


Abbildung 55: ^1H -NMR-Spektrum von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal), erhalten mit Trimethylsilylchlorid (TMSCl) und Imidazol, gemessen in D_2O .

Die Wiederholungseinheit des Polymers zeigt Signale bei 68,6; 69,2; 71,4; 78,5 und bei 99,6 ppm. Das nach der Behandlung mit HMDS erhaltene Material zeigt zwei tieffeldverschobene Signale. Das eine Signal bei 157,4 ppm entspricht der Ammoniumsalzform von PGaIS und das andere bei 174,6 ppm kann einer Amidgruppe zugeordnet werden.

Die bei der Umsetzung von PGaIS mit HMDS und TMSCl/Imidazol erhaltenen Proben wurden FTIR-spektroskopisch untersucht (Abbildung 57). Als Vergleich sind die Spektren von PGaIS, Ammoniumpolygalacturonat und TMS-PGal gezeigt. Die praktisch vollständige Umwandlung der Säure in die Ammoniumsalzform während der Reaktion wird durch das Auftreten einer Bande bei 1620 cm^{-1} angezeigt. Die Si-CH_3 -Gruppen sind durch zwei scharfe Signale bei 1257 cm^{-1} und 844 cm^{-1} charakterisierbar.^[203] In den Produkten, die aus der Reaktion des Biopolymers mit HMDS erhalten wurden, werden typische Amid-I- und Amid-II-Banden im Spektrum bei 1697 cm^{-1} und 1723 cm^{-1} gefunden.

3 Spezieller Teil

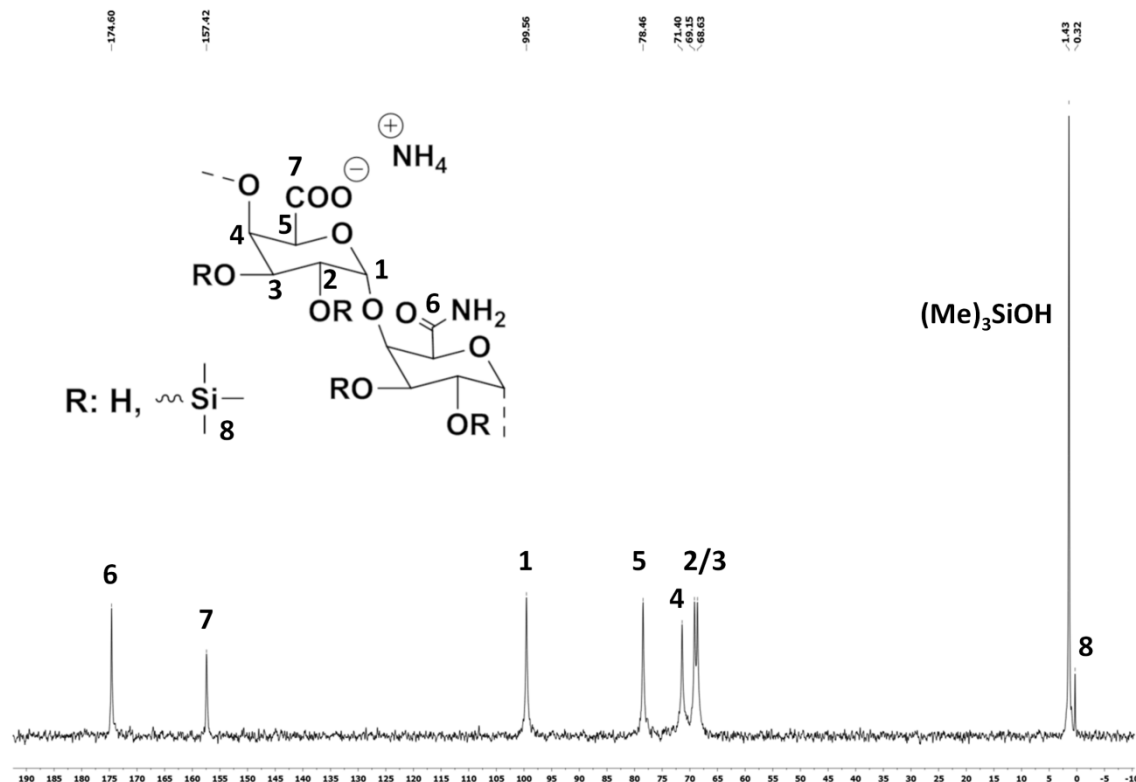


Abbildung 56: ¹³C-NMR-Spektrum von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal), erhalten aus der Reaktion von Polygalacturonsäure (PGaIS) mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS), gemessen in #D₂O.

Dieser Befund, unterstützt durch das ¹³C-NMR-Carbonylsignal bei 174,6 ppm, lässt sich darauf zurückführen, dass während der Synthese freiwerdender Ammoniak mit einer silylierten, also aktivierten, Carbonsäurefunktion reagiert hat (Abbildung 58a).^[269] Offensichtlich reagiert Ammoniak mit der silylierten Carbonsäurefunktion schneller als die noch am Polymerrückgrat vorhandenen Hydroxylfunktionen. Dieser Befund stützt sich darauf, dass keine vernetzten und damit unlöslichen Produkte erhalten wurden. Es konnte auch keine Molmassenerhöhung nach der Umsetzung beobachtet werden, die auf eine Polymerkettenverknüpfung zurückzuführen wäre (Abbildung 58b).

Die GPC der vollständig hydrolysierten Materialien zeigte, dass sich die Molekülmassen nach der Trimethylsilylierung von PGaIS und der anschließenden Hydrolyse, in Abhängigkeit von den verwendeten Reagenzien, stark unterscheiden (HMDS Abbildung 59 und TMSCl Abbildung 60). Die Reaktion des Biopolymers mit HMDS führt zu einer verlängerten Retention des Materials auf der Säule, woraus sich auf eine Abnahme der Molmasse schließen lässt (Abbildung 59).

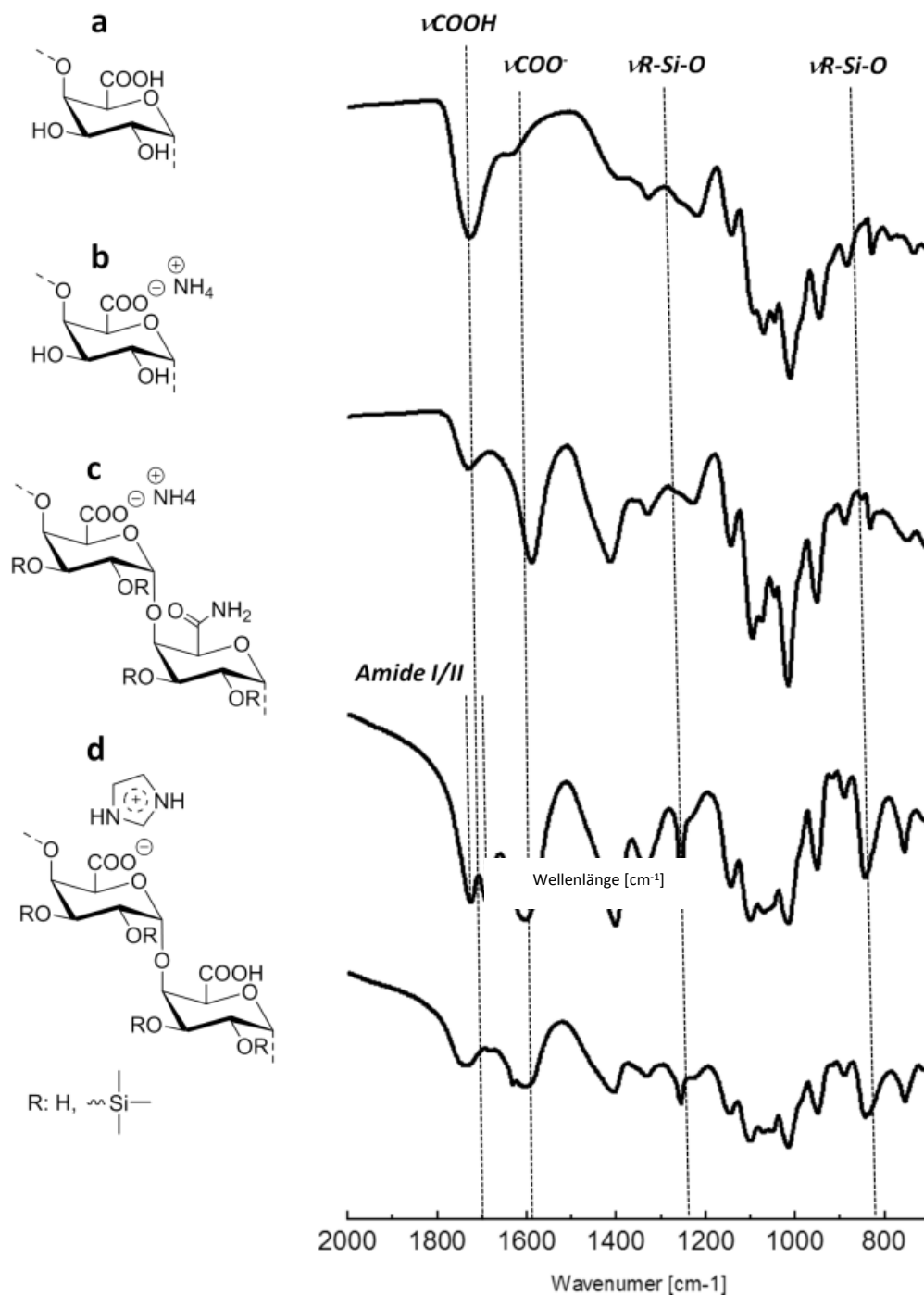


Abbildung 57: FTIR-Spektren (KBr) von a) Polygalacturonsäure (PGaI), b) Ammoniumpolygalacturonat, c) Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal), erhalten mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan und d) TMS-PGal mit Trimethylsilylchlorid / Imidazol.

Es wurde beschrieben, dass der Biopolymerabbau im Basischen durch β -Eliminierung erfolgt.^[270] Somit kann Ammoniak, das während der Reaktion aus dem HMDS freigesetzt wird, als Nukleophil wirken, welches das Biopolymerrückgrat angreift und für einen Kettenabbau sorgt.

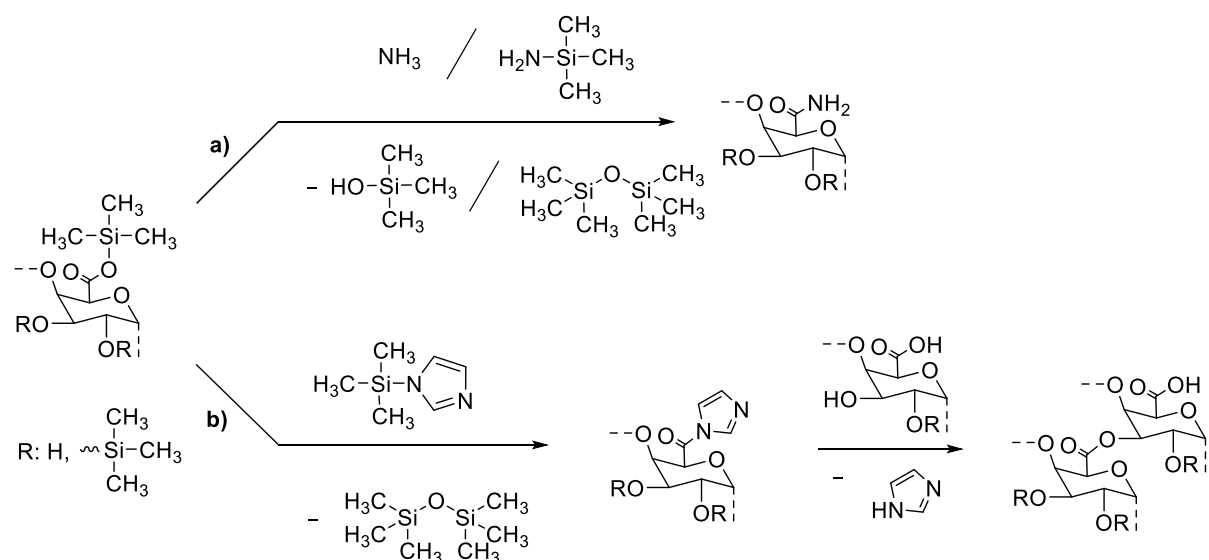


Abbildung 58: Nebenreaktion bei der Silylierung von Polygalacturonsäure. a) Die Umsetzung mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan wandelt die aktivierte Carbonsäure in ein Amid um. b) Die Umsetzung mit Trimethylsilylchlorid und Imidazol kann durch Esterbildung zur Vernetzung führen. Eine Imidazolid-Spezies ist das wahrscheinlichste Zwischenprodukt für diese Nebenreaktion.

Die bei der Silylierung unter Verwendung von TMSCl erhaltenen Produkte zeigen nach ihrer Hydrolyse, im Vergleich zum Standard, eine signifikant kürzere Retentionszeit (Abbildung 60). Die kürzeren Retentionszeiten entsprechen einer Zunahme der Molekülmasse. Allerdings kann dieser Befund nicht durch die Salzbildung der Carbonsäurefunktion des Biopolymers mit Imidazol erklärt werden. Die Zunahme der Kettenlänge kann jedoch aus der Verknüpfung zwischen verschiedenen Biopolymerkettens resultieren. Die Reaktionsbedingungen führen dazu, dass die Carbonsäuregruppen der PGaIS direkt mit dem Silylderivat zum entsprechenden reaktiven Imidazolid reagieren.^[271] So können die Hydroxygruppen des Polymergerüsts mit der aktivierten Carbonsäure reagieren, was zur Veresterung zwischen zwei PGaIS-Ketten führt (Abbildung 58b). Die Bildung von Estergruppen war nur bei den Reaktionen von TMSCl/Imidazol nachweisbar. Der niedrige DS-Wert nach der Silylierung mit TMSCl zeigt, dass die Hydroxygruppen des Polysaccharids nicht ausreichend blockiert sind und somit als Nukleophil in einer intra- oder intermolekularen Veresterungsreaktion reagieren können. Die Tatsache, dass das Polymer löslich ist, weist auf ein eher geringes Ausmaß dieser Nebenreaktion hin, wobei schon wenige Verknüpfungsstellen für ein signifikantes Ansteigen der Molmasse ausreichen.

Die Prüfung auf Einfluss des Korrosionsschutzes beim Einsatz in einer wasserbasierten Tauchbeschichtung erfolgte über die Abscheidung mittels Tauchprozess mit anschließender normkonformen Korrosionsprüfung durch einen neutralen Salzsprühtest (NSS-Test).

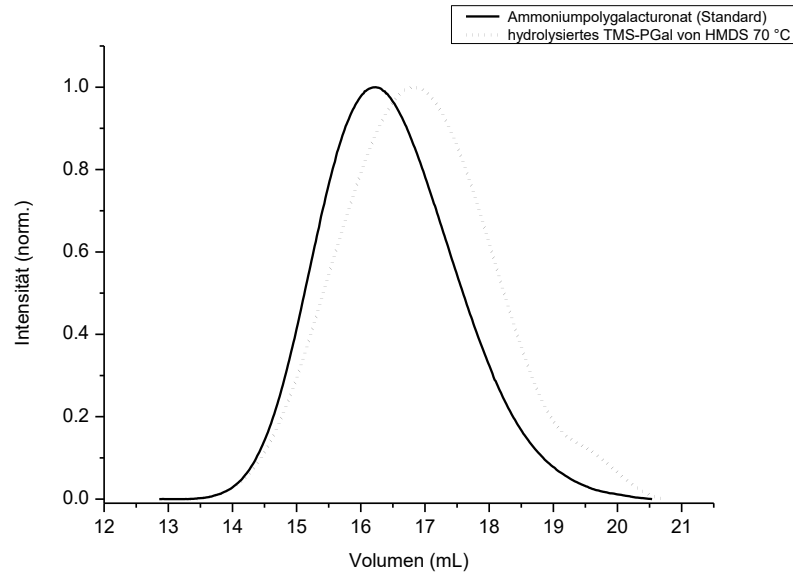


Abbildung 59: Elutionskurven von Ammoniumpolygalacturonat und ein hydrolysiertes Trimethylsilylpolygalacturonat (Si 10) aus der Synthese mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan bei 70 °C synthetisiert wurde, gemessen in Wasser.

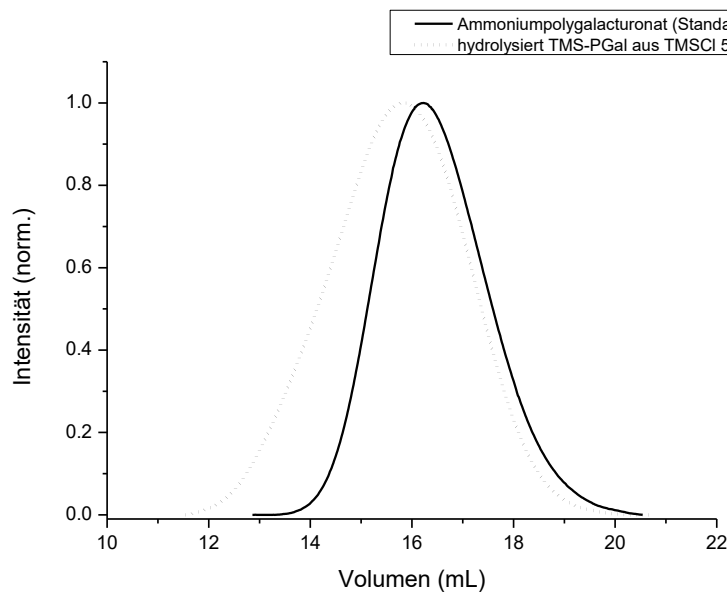


Abbildung 60: Elutionskurven von Ammoniumpolygalacturonat und ein hydrolysiertes Trimethylsilylpolygalacturonat (Si 4), das mit Trimethylsilylchlorid bei 50 °C synthetisiert wurde, gemessen in Wasser.

Dafür wurden die substituierten Derivate in einem Massenanteil < 1 m% zu der synthetischen Polymerdispersion gegeben und diese durch Tauchen auf einer Standard-Stahloberfläche abgeschieden. Nach dem Einbrennvorgang (15 min bei 180 °C) wurde die Korrosionsschutzprüfung durchgeführt (NSS-Test, DIN EN ISO 9227). Die erhaltenen TMS-PGal zeigten allerdings, bedingt durch eine schnelle Hydrolyse der TMS-Gruppen, gegenüber dem Standard (Ammoniumpektinat) keine verbesserten Eigenschaften für diese Anwendung.

3 Spezieller Teil

Nach der Umsetzung von PGaIS mit TMSCl und HMDS sollte weiter untersucht werden, ob eine Umsetzung auch mit sterisch anspruchsvollen Silylderivaten möglich ist. Hierbei sollten sich organolösliche Derivate synthetisieren lassen, welche im Vergleich mit den TMS-PGaIS-Derivaten eine geringere Hydrolysetendenz aufweisen. Um die Reaktivität der Silanverbindungen vergleichen zu können und das Löslichkeitsverhalten der erhaltenen PGal-Derivate zu untersuchen, wurden unterschiedliche, kommerziell erhältliche Dimethylchlorosilanderivate mit PGaIS in Formamid umgesetzt (Abbildung 61).

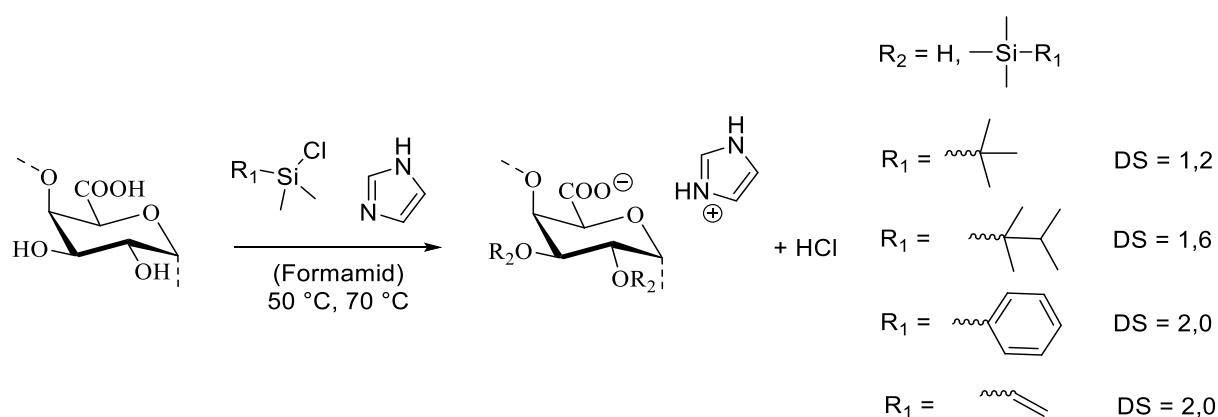


Abbildung 61: Schema zur Silylierung von Polygalacturonsäure (PGaIS) in Formamid mit *tert*-Hexyldimethylchlorsilan (TDSCI), *tert*-Butyldimethylchlorsilan (tBDMCI), Dimethylvinylchlorsilan (DMVinCI) und Dimethylphenylchlorsilan (DMPSCI) bei erhöhten Temperaturen (50 °C und 70 °C).

In den Versuchsreihen wurden *tert*-Hexyldimethylchlorsilan (TDSCI), *tert*-Butyldimethylchlorsilan (tBDMCI), Dimethylvinylchlorsilan (DMVinCI) und Dimethylphenylchlorsilan (DMPSCI) als Reagenzien zusammen mit Imidazol als Base und Katalysator verwendet. Die Reaktionstemperatur wurde von 50 °C bis 70 °C variiert. Die Menge an Silylierungsreagenz wurde zwischen 4,0 und 16,0 Äquivalenten (bezogen auf die Anhydrogalacturonsäure-Einheit, AGaIE) variiert. Die Base wurde, bezogen auf das Silylierungsreagenz, im 1,5-fachen Überschuss eingesetzt, um die begleitende Salzbildung mit der Carbonsäurefunktion des Polysaccharids zu kompensieren (Tabelle 8).

Die Bestimmung des DS-Wertes erfolgte über zwei unabhängige Methoden. Zum einen wurde die ¹H-NMR-Spektroskopie eingesetzt und aus dem Integralverhältnis des Silylpeaks zu dem PGal-Rückgrat der DS berechnet. Zum anderen wurde nach einer Veraschung der Probe der Gehalt an SiO₂ gravimetrisch bestimmt. Beide Methoden korrelierten sehr gut miteinander, die Abweichungen betrugen maximal ± 0,1 DS-Einheiten.

3 Spezieller Teil

Tabelle 8: Reaktionsparameter und Produkte aus der Umsetzung von Polygalacturonsäure (PGaIS) in Formamid mit tert-Hexyldimethylchlorsilan (TDSCI), tert-Butyldimethylchlorsilan (tBDMCI), Dimethylvinylchlorsilan (DMVinCl) und Dimethylphenylchlorsilan (DMPSCI) zusammen mit Imidazol als Base (je 1,5 Äquivalenten bezogen auf das Chlorsilan).

Reaktionsparameter				Produkt		
Reagenz	Reagenz/Base [Äquiv.]	Zeit [h]	Temp. [°C]	Nr.	DS ¹	DS ²
TDSCI	4,0/6,0	3	50	Si 12	0,3	0,2
TDSCI	4,0/6,0	6	50	Si 13	0,5	0,4
TDSCI	4,0/6,0	12	50	Si 14	0,7	0,8
TDSCI	6,0/9,0	6	50	Si 15	1,1	1,0
TDSCI	6,0/9,0	12	50	Si 16	1,2	1,2
TDSCI	8,0/12,0	12	50	Si 17	1,4	1,5
TDSCI	16,0/24,0	12	70	Si 18	1,5	1,4
tBDMCI	4,0/6,0	6	50	Si 19	0,4	0,6
tBDMCI	4,0/6,0	12	50	Si 20	1,0	0,9
tBDMCI	8,0/12,0	12	50	Si 21	1,2	1,1
tBDMCI	16,0/24,0	12	70	Si 22	1,2	1,2
DMPSCI	4,0/6,0	3	50	Si 23	0,4	0,3
DMPSCI	4,0/6,0	6	50	Si 24	0,7	0,6
DMPSCI	4,0/6,0	12	50	Si 25	1,0	1,1
DMPSCI	8,0/12,0	12	50	Si 26	1,5	1,5
DMPSCI	16,0/24,0	12	50	Si 27	1,8	1,9
DMPSCI	16,0/24,0	12	70	Si 28	2,0	2,0
DMVinCl	4,0/6,0	6	50	Si 29	1,0	0,9
DMVinCl	4,0/6,0	12	50	Si 30	1,2	1,2
DMVinCl	8,0/12,0	12	50	Si 31	1,8	1,9
DMVinCl	16,0/24,0	12	70	Si 32	2,0	2,0

¹DS – durchschnittlicher Substitutionsgrad berechnet aus ¹H NMR Daten und ²berechnet aus Siliziumbestimmung.

3 Spezieller Teil

Bei den Umsetzungen mit *tert*-Hexyldimethylchlorsilan zeigte sich unter den untersuchten Reaktionsbedingungen eine Obergrenze für einen Silylierungsgrad mit diesem Reagenz von DS ca. 1,5 für PGaIS (Tabelle 8). Anfänglich korrelierte der steigende DS-Wert, bei gleichbleibender Reaktionstemperatur von 50 °C, mit der Reaktionszeit, so dass bei 4 Äquivalenten TMSCl nach 3 h, 6 h und 12 h ein DS von 0,3; 0,5 und 0,7 erreicht wurden. Durch eine Verdopplung der Silanmenge auf 8 Äquivalenten bei 12 h Reaktionszeit ließ sich der DS auf 1,4 verdoppeln. Eine signifikante Steigerung ist, wie bereits erwähnt, für dieses Silylierungsreagenz nicht mehr möglich. Eine Umsetzung mit 16 Äquivalenten des Chlorsilans und zusätzlicher Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 70 °C erzeugte lediglich einen DS von 1,5, der den vorrangegangenen Werten, im Rahmen der Genauigkeit, nahezu glich.

Für die Umsetzungen von PGaIS mit tBDMCl lässt sich ein ähnlicher Trend wie für das TDSCl erkennen. Bei der Umsetzung von 4 Äquivalenten des Chlorsilans mit PGaIS bei 50 °C ergab sich nach 6h Reaktionszeit ein Substitutionsgrad von DS 0,5. Dieser stieg bei der doppelten Reaktionszeit auf DS 0,9. Eine Erhöhung der Chlorsilanmenge auf 8 Äquiv. bei 12 h Reaktionszeit und gleicher Reaktionstemperatur erzeugte lediglich einen marginalen Anstieg des DS-Wertes auf DS 1,2. Eine erneute Verdopplung der Chlorsilanmenge auf 16 Äquivalenten ließ keine weitere Steigerung des DS verzeichnen.

Bei der Umsetzung von PGaIS mit Dimethylphenylchlorsilan zeigte sich der gleiche Trend wie bei den zuvor betrachteten Chlorsilanreagenzien. Beim Einsatz von 4 Äquivalenten des Reagenz war nach 3 h, 6 h und 12 h Reaktionszeit ein Anstieg des Substitutionsgrades erkennbar von DS 0,4 über 0,7 hin zu 1,0. Beim Einsatz von 8 Äquivalenten Reagenz lag nach 24 h Umsetzungszeit bei 50 °C ein DS von 1,5 vor. Eine vollständige Silylierung der Hydroxygruppen (entsprechend DS 2,0) ließ sich mit dem Einsatz von 16 Äquivalenten Reagenz, 24 h Reaktionszeit und 70 °C Reaktionstemperatur erreichen.

Mit Dimethylvinylchlorsilan war ebenfalls eine vollständige Substitution der OH-Funktionen an der PGaIS möglich. Die erhaltenen DS-Werte stiegen bei diesen Umsetzungen von DS 1,0 (4 Äquivalenten Reagenz bei 50 °C für 6 h) über DS 1,8 (8 Äquivalenten Reagenz bei 50 °C für 6 h) zum DS 2,0 (16 Äquivalenten Reagenz bei 70 °C für 12 h).

Die beiden letztgenannten Reagenzien (DMPSCl und DMVinCl) erlauben bei langer Reaktionszeit (24 h) und Temperaturen von 70 °C die vollständige Umsetzung der Hydroxygruppen, im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Reagenzien (TDSCl und tBDMCl). Als Grund für diese unterschiedliche Reaktivität ist wahrscheinlich die

unterschiedliche sterische Hinderung der Verbindungen zu nennen. TDSCI und tBDMCI besitzen mit ihrem 2,2,3-Trimethylbutyl- und *tert*-Butylrest räumlich stark abschirmende Gruppen, die eine Zweitsubstitution am PGalS-Rückgrat verhindern. Im Gegensatz dazu besitzt der planare Phenylrest im DMPSCI die Möglichkeit, durch Rotation dem sterischen Einfluss eines Zweitsubstituenten auszuweichen. Der Vinylrest im DMVinCI ist vergleichsweise klein und kann ebenfalls frei um seine Einfachbindung rotieren. Damit ist dieser Rest nicht zu einer großen sterischen Abschirmung befähigt, was sich in den erreichten DS-Werten widerspiegelt.

Die synthetisierten Verbindungen sind durchgängig farblose Materialien, die ein differenzierteres Lösungsverhalten aufweisen. Im Gegensatz zu den TMS-PGal-Derivaten, welche durchgängig in Wasser löslich waren, hatten die TDSCI und tBDMCI Verbindungen eine vom DS-Wert abhängige Löslichkeit. Die TDS-PGal waren bis zu einem DS von 0,5 wasserlöslich. Ab einem DS von 0,4 sind die Proben zusätzlich in DMSO löslich. Dieses Ergebnis lässt sich durch die Erhöhung des hydrophoben Charakters der TDS-PGal, mit steigendem DS, erklären. Bei weiteren Lösungsversuchen in Chloroform, THF, DMA, DMF oder MeOH, war keine Löslichkeit der untersuchten Materialien zu verzeichnen. Wie zu erwarten, hatten die erhaltenen tBDM-PGal-Proben den gleichen Löslichkeitstrend wie die TDS-PGal-Derivate. Die Substanzen waren bei DS 0,6 in Wasser wie auch DMSO-löslich, bei $DS > 0,6$ nur noch DMSO-löslich. Bei dem Screening auf weitere Lösungsmittel ließ sich beobachten, dass die Proben bis zu einem $DS < 1,0$ in heißem MeOH löslich sind und es zu keinem Ausfallen beim Abkühlen kam. Alle weiteren untersuchten Lösungsmittel ($CHCl_3$, THF, DMA, DMF oder MeOH) waren nicht in der Lage das Polysaccharidderivat zu lösen, selbst das DMP-PGal-Derivat (**Si 28**) war lediglich in DMSO löslich. Das Löslichkeitsverhalten der DMVin-PGal Derivate unterschied sich von den anderen Silylpolygalacturonaten. Die Derivate sind bis zu einem Substitutionsgrad von 1,2 (**Si 30**) wasserlöslich. Darüber hinaus ($DS > 1,2$) sind die Derivate nur DMSO-löslich.

Da wässrige Lösungen der trimethylsilylierten Polygalacturonate nicht hydrolysestabil sind, sollte dies auch bei den wasserlöslichen TDS-PGal (**Si 12**) untersucht werden. Es wurde festgestellt, dass TDS-PGal in Wasser äußerst hydrolysestabil ist. Es konnten auch nach 24 h keine Zersetzungsprodukte im 1H -NMR Spektrum beobachtet werden (Abbildung 62). Unterstützt wird diese Aussage durch die Messung eines NMR-Diffusionsspektrums (Abbildung 63). Die Probe **Si 12** wurde in Deuteriumoxid gelöst, für 24 h bei RT gelagert und

3 Spezieller Teil

anschließend NMR-spektroskopisch untersucht. Das erhaltene Protonen-NMR-Spektrum zeigt Signale bei 0,12; 0,81 und 1,57 ppm, welche der *tert*-Hexyldimethylsilyl-Einheit zugeordnet werden können (Abbildung 62). Zusätzlich zu den Signalen der Wiederholungseinheit (3,69; 3,95; 4,36 und 5,01 ppm) existieren zwei Signale (7,42; 8,34 ppm) des kationischen Imidazolgegenions. Diese Salzbildung bildet die Grundlage für die Löslichkeit in Deuteriumoxid. Das fehlende Signal für das Proton an C4 ist mit dem Deuteriumoxid-Signal überlagert.

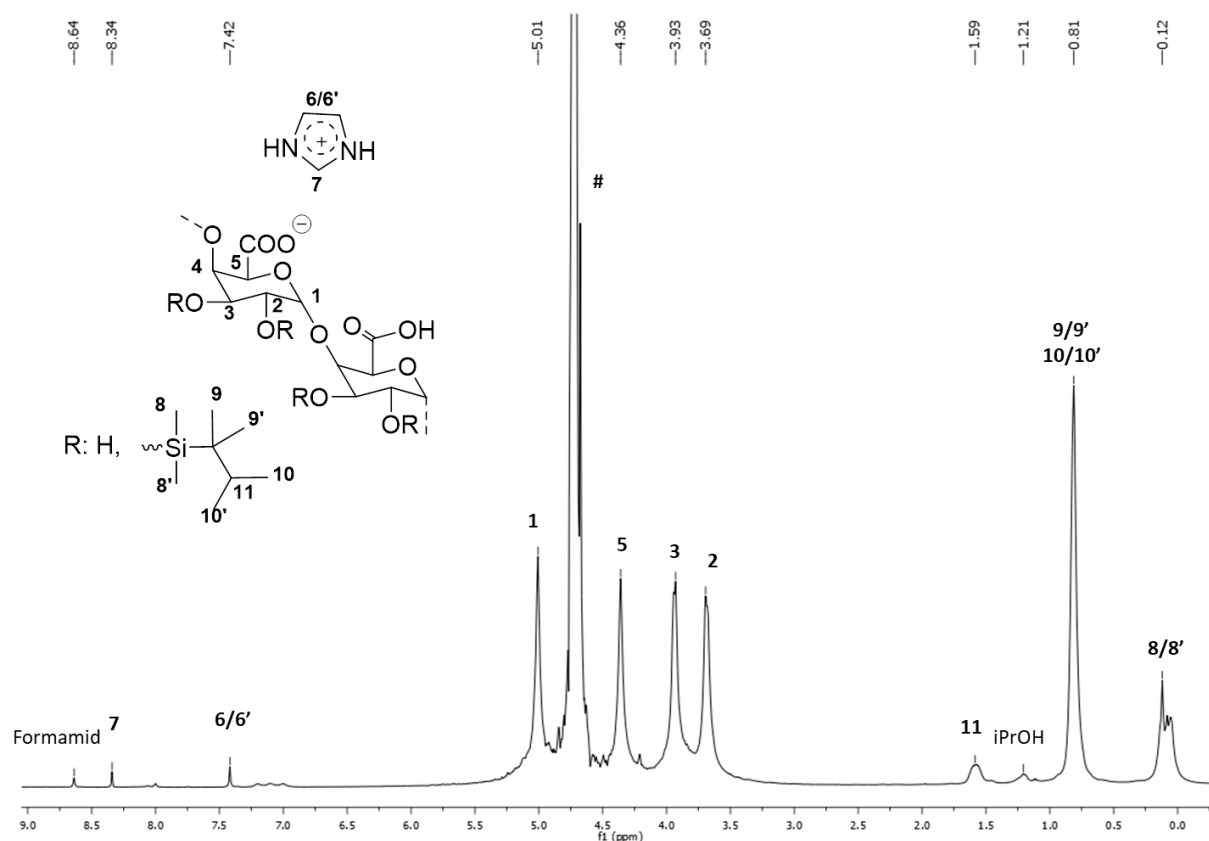


Abbildung 62: ^1H -NMR-Spektrum von *tert*-Hexyldimethylsilylpolygalacturonat (TDS-PGal, **Si-12**), gemessen in D_2O .

Im erhaltenen ^1H -NMR-Diffusionsspektrum sind alle Signale noch einmal zugeordnet (Abbildung 63). Es ist zu erkennen, dass die Signale der AGE (5,5 ppm - 4,0 ppm) mit dem verknüpften TDS-Rest (0,12 ppm und 0,81 ppm) einen vergleichbaren Diffusionskoeffizienten aufweisen. Dies ist ein klarer Nachweis für die Hydrolysestabilität der TDS-Gruppe. Bei einer Abspaltung der TDMS-Gruppe ändert sich der Diffusionskoeffizient der abgespaltenen Reste (TDMS-OH) signifikant (nimmt zu) aufgrund der stark unterschiedlichen Molmassen zwischen Polymer und Silanol. Dieser Geschwindigkeitsunterschied wird durch das im Spektrum erkennbare HDO-Signal ersichtlich.

3 Spezieller Teil

Die nicht wasserlöslichen TDS-PGal-Derivate wurden in DMSO-d₆ NMR-spektroskopisch untersucht. In Abbildung 64 ist das ¹H-NMR von Verbindung **Si 17** in DMSO-d₆ gezeigt. Signale bei 0,01 ppm; 0,76 - 0,86 ppm und 1,57 ppm lassen sich der *tert*-Hexyldimethylsilyl-Einheit zugeordnen. Die Signale der AGE sind aufgrund des hohen Silylierungsgrades schlecht aufgelöst und somit sehr breit (3,4 ppm – 5,4 ppm). Zusätzlich zur Wiederholungseinheit findet man zwei weitere Signale (7,07 ppm; 7,76 ppm), welche dem Imidazoliumkation zugeordnet werden können. Im Unterschied zu dem in Deuteriumoxid aufgenommenen Spektrum ist das Signal der Wiederholungseinheit wesentlich schwächer. Hierfür ist wahrscheinlich der höhere Substitutionsgrad verantwortlich. Es zeigt sich, dass die Signale für die Protonen an C9/9' und C10/10' getrennt werden können. Weiter sind die höher substituierten PGaIS-Derivate durch ihren weniger hydrophilen Charakter leichter vom anhaftenden Fällmedium (Isopropanol) durch Vakuumtrocknung zu reinigen. Es sind keine Signale von Isopropanol in der Verbindung nachweisbar.

Um den DS aus den erhaltenen Spektren zu bestimmen, musste unterschiedlich vorgegangen werden. Bei den in Deuteriumoxid aufgenommenen ¹H-Spektren wurden die Integrale von H1 und H2 zusammen auf zwei gesetzt und anschließend die Signale der Silylgruppe integriert. Bei den in DMSO aufgenommenen ¹H-Spektren konnte das Integral über die gesamte AGE, also die Summe aus H1-H5 auf $\Sigma = 5$, gesetzt werden. Anschließend wurden die Signale der TDS-Gruppe damit korreliert (Abbildung 64).

In Abbildung 65 ist das Protonen-NMR-Spektrum von **Si 19** dargestellt. Signale bei 0,04 ppm und 0,87 ppm sind der *tert*-Butyldimethylsilyl-Einheit zuzuordnen. Die Signale der AGE sind aufgrund des Silylierungsgrades schlecht aufgelöst und sehr breit (3,4 ppm – 5,4 ppm). Wie in den zuvor diskutierten Spektren finden sich zwei weitere Signale (7,01 ppm; 7,64 ppm), welche dem Imidazoliumkation des Polygalacturonats zugeordnet werden können.

Die analytische Aufklärung des DMP-PGal-Derivates erfolge analog zu der des tBDM-PGal. Die Probe **Si 28** (in DMSO-d₆) zeigt Signale im Protonen-NMR-Spektrum (Abbildung 66) bei 0,27 ppm und 0,32 ppm, welche den beiden Methylgruppen (Position 8 und 8') der Dimethylphenylsilyl-Einheit zugeordnet werden können. Die leichte Aufspaltung der Signale kommt durch die unterschiedliche Verschiebung, welche aufgrund der Anbindung an C2 und C3 folgt. Die Signale des Phenylrings sind bei 7,39 ppm und 7,55 ppm als Multiplett zu erkennen. Sie liegen genau zwischen den Signalen des Imidazoliumkations, welche bei 7,08 ppm und 7,76 ppm erscheinen. Aus den Integralverhältnissen ließ sich ein DS von 2,0

3 Spezieller Teil

ermitteln, welcher sich sowohl aus den Integralen der Dimethylgruppen als auch den Aromaten ergab.

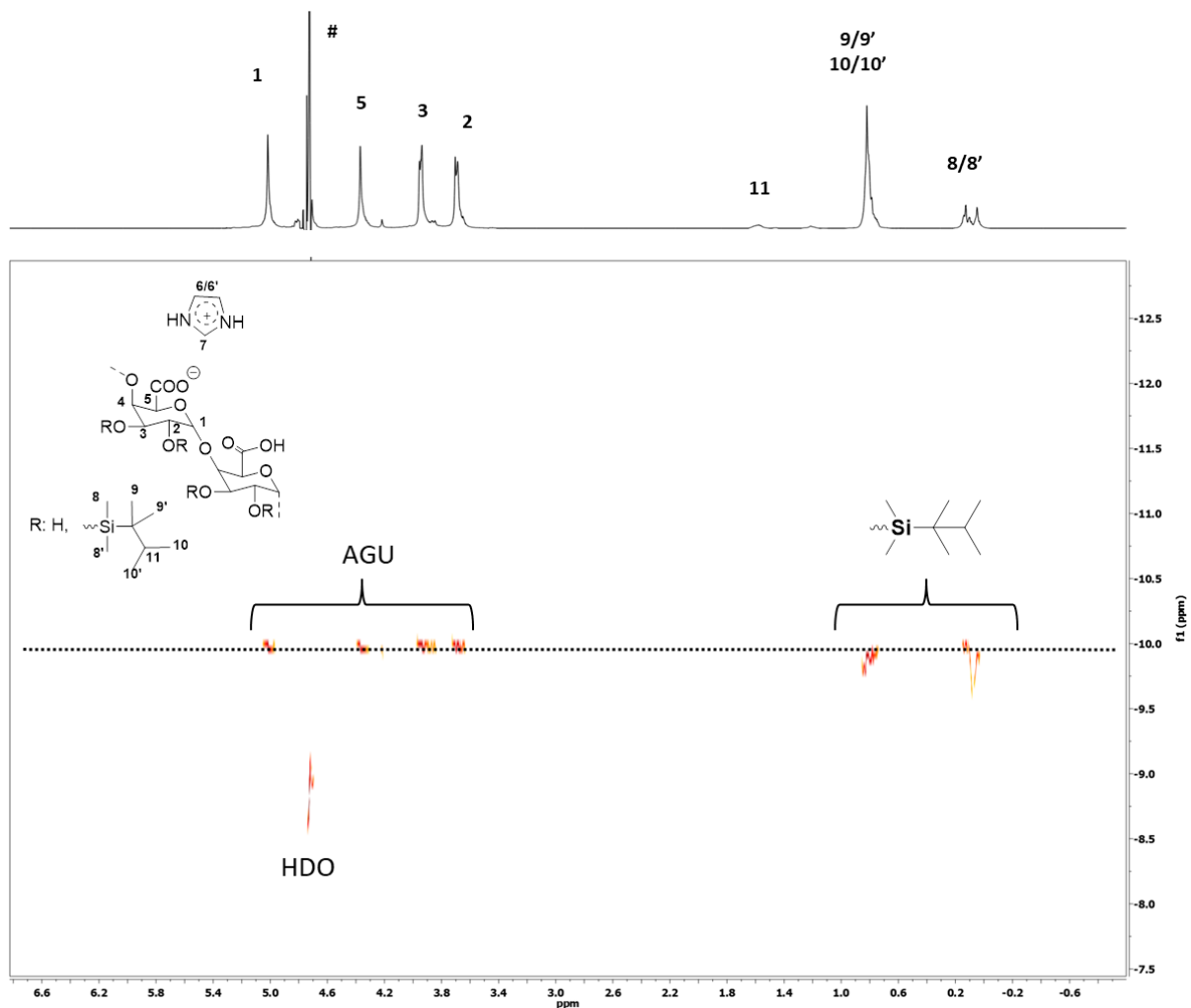


Abbildung 63: Diffusions-NMR-Spektrum von tert-Hexyldimethylsilylpolygalacturonat (TDS-PGal, **Si 12**) in Deuteriumoxid. Vergleichbare Diffusionskoeffizienten zeigen die Stabilität der Si-O Bindung zwischen PGals und dem Silan gekennzeichnet durch eine gestrichelte Linie.

Im Protonen-NMR-Spektrum des DMVin-PGal Derivats **Si 32** sind die Signale bei 0,09 ppm und 0,14 ppm eindeutig den Methylgruppen, benachbart zum Silizium, zuzuordnen (Abbildung 67). Die leichte Aufspaltung der Signale kommt durch die unterschiedliche chemische Umgebung bei der Substitution an C2-OH und C3-OH zustande. Die Vinylgruppe ist durch Signale bei 5,6 ppm bis 6,3 ppm klar erkennbar. Die Signale der AGE sind schwach bei 3,4 ppm - 5,4 ppm zu finden. Wie in allen zuvor gezeigten Spektren sind auch hier die Signale des gebildeten Imidazoliumkations bei 7,06 ppm und 7,74 ppm erkennbar.

3 Spezieller Teil

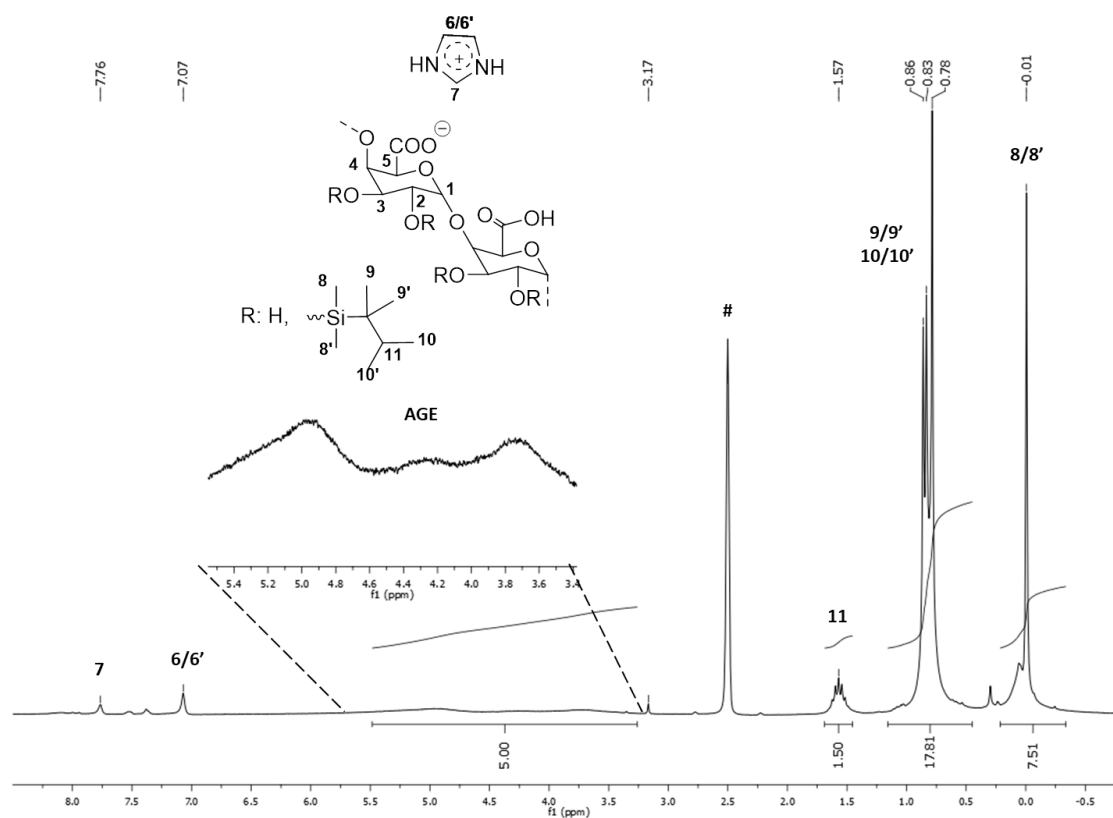


Abbildung 64: ^1H -NMR-Spektrum von *tert*-Hexyldimethylsilylpolygalacturonat (TDS-PGal, Si 16), erhalten durch die Umsetzung mit *tert*-Hexyldimethylchlorsilan (TDSCI), gemessen in $^{\#}\text{DMSO-d}_6$.

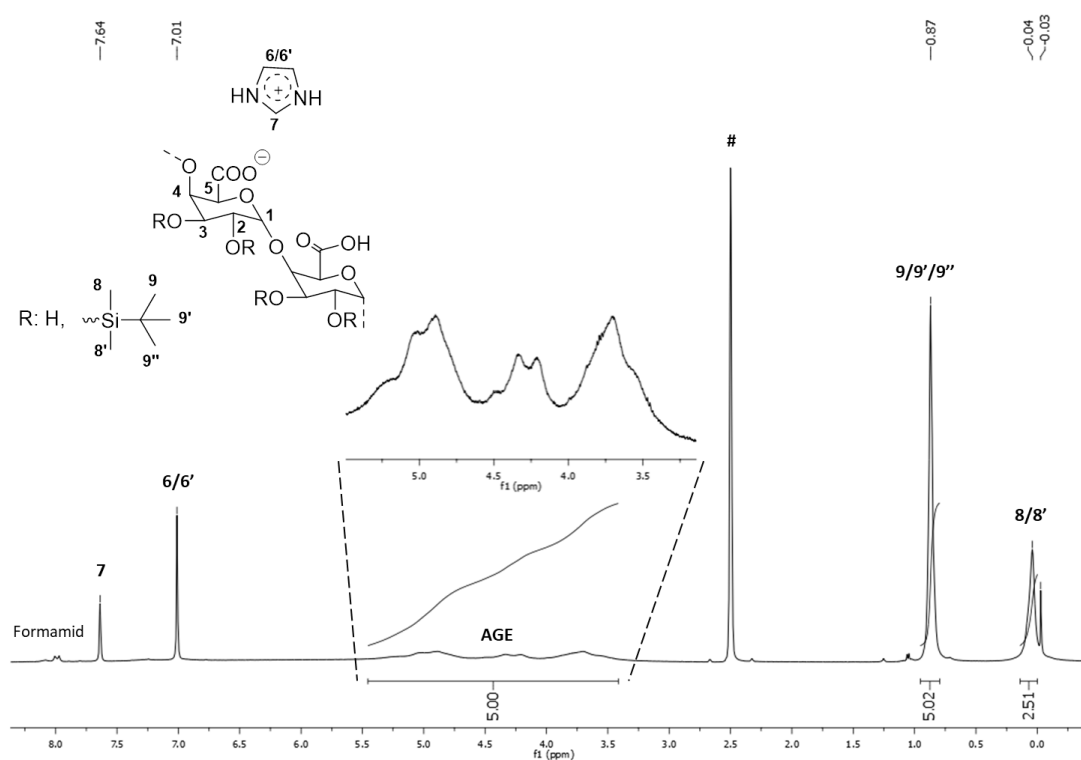


Abbildung 65: ^1H -NMR-Spektrum von *tert*-Butyldimethylsilylpolygalacturonat (tBDM-PGal, Si 19), gemessen in $^{\#}\text{DMSO-d}_6$.

3 Spezieller Teil

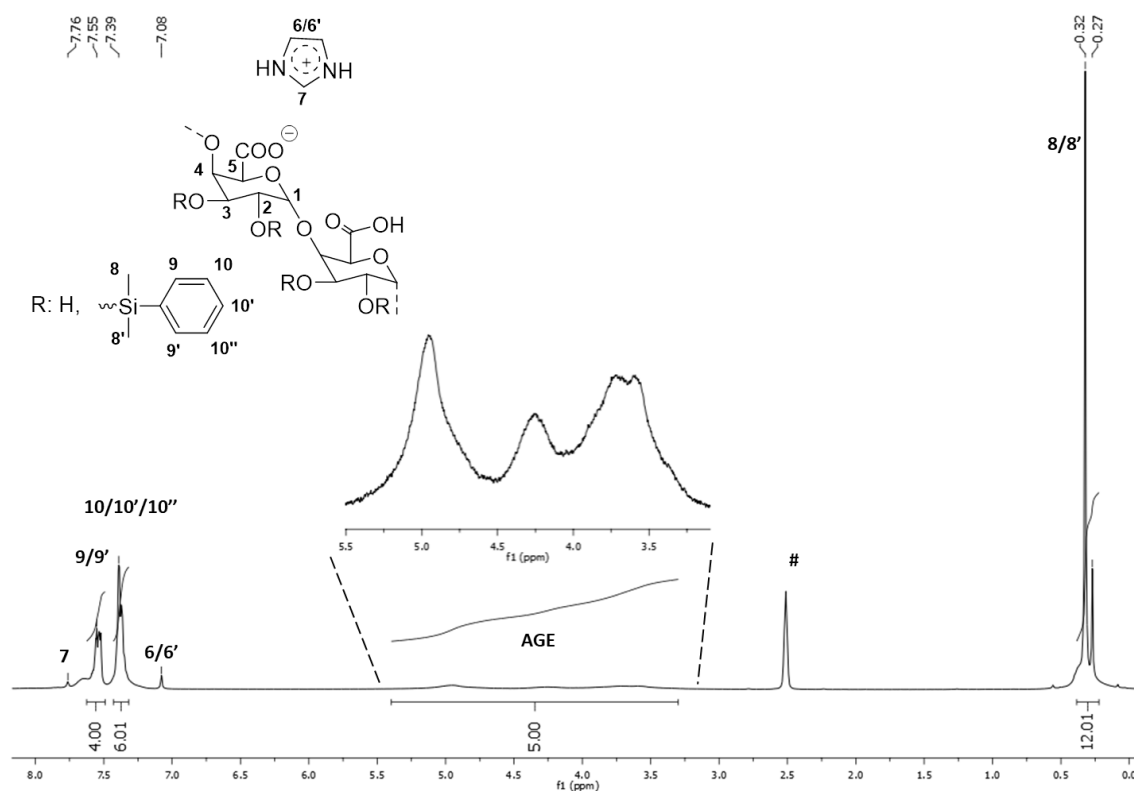


Abbildung 66: ^1H -NMR-Spektrum von Dimethylphenylsilylpolygalacturonat (DMP-PGal, Si 28), in $^{\text{H}}\text{DMSO-d}_6$.

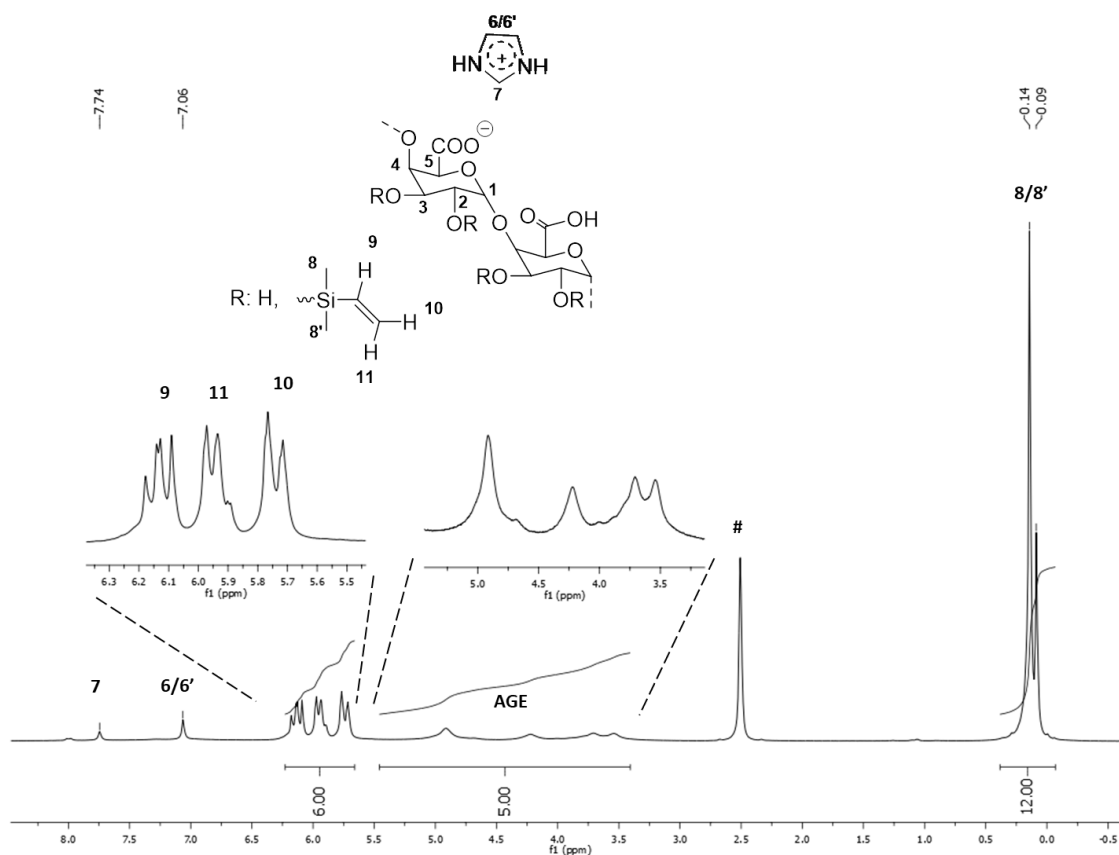


Abbildung 67: ^1H -NMR-Spektrum von Dimethylvinylsilylpolygalacturonat (DMVin-PGal, Si 32), erhalten durch die Umsetzung mit Dimethylvinylchlorosilan (DMVinCl), gemessen in $^{\text{H}}\text{DMSO-d}_6$.

Weiterführend wurden die silylierten PGal-Derivate mit Hilfe der GPC charakterisiert. Um die Proben mit den unterschiedlichen Substituenten vergleichen zu können, wurde versucht, ein Imidazoliumpolygalacturonat als Referenzmaterial zu verwenden. Die Verbindung ließ sich jedoch nicht in dem Elutionsmittel DMSO lösen. So musste auf das literaturbekannte DMSO-lösliche Tetrabutylammonium Polygalacturonat zurückgegriffen werden.^[161]

Die Elugramme zeigen einen Trend bei den Silylierungsversuchen von PGalS in Formamid. Mit zunehmendem DS steigt die Polymermasse der Derivate an. Dieser Befund lässt sich sehr deutlich in den Elugrammen für TDSCI (**Si 18**), tBDMCl (**Si 22**) und DMPSCI (**Si 28**) erkennen. Gegenüber den gering substituierten Analoga (**Si 14**, **Si 19** und **Si 24**) ist ihre Retentionszeit um fast eine Minute verkürzt, was sich als Molmassenzunahme deuten lässt. Dieser Effekt ist bei den Vinylsilanen (**Si 32** und **Si 29**) wesentlich weniger stark ausgeprägt. Es lässt sich ebenfalls nicht ausschließen, dass eine intramolekulare Veresterungsreaktion durch *in situ* Aktivierung, wie bei TMS-Polygalacturonat, stattfindet. Hierdurch lässt sich eine signifikante Molmassenzunahme, wie bei **Si 28**, ebenfalls erklären.

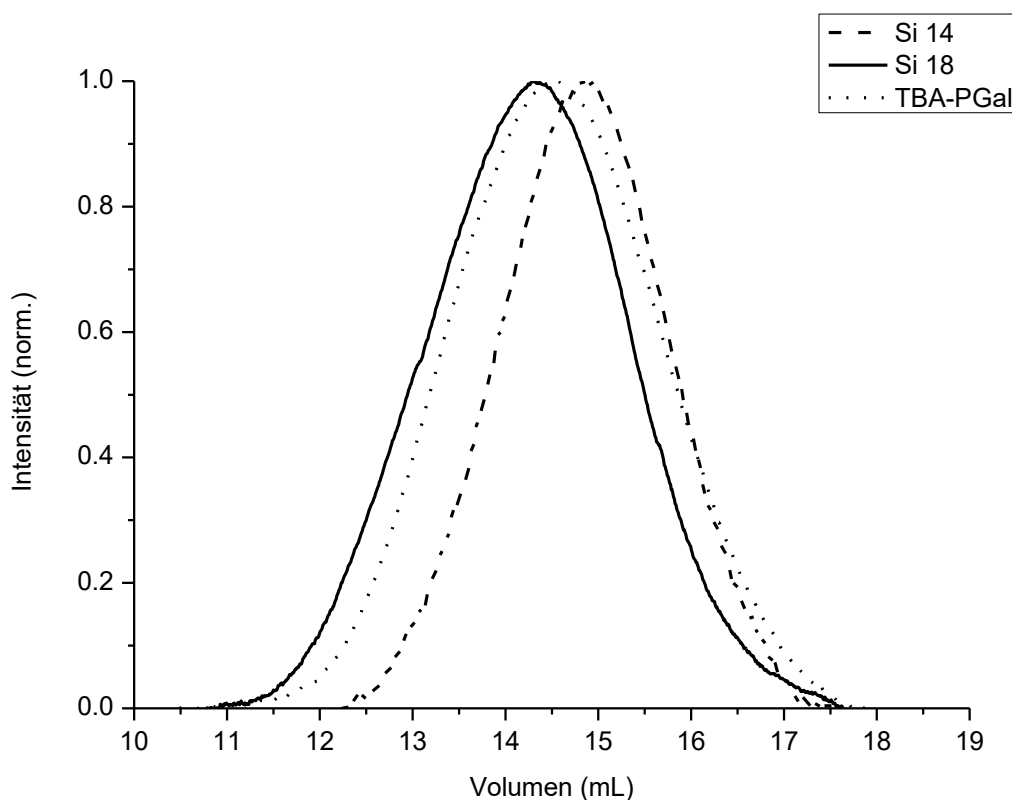


Abbildung 68: Größenausschlusschromatogramm, welches das Elutionsvolumen gegen die Signalintensität für Tetrabutylammoniumpolygalacturonat (TBA-PGal, als Referenzmaterial) und von zwei tert-Hexyldimethylsilylpolygalacturonaten (TDS-PGal, **Si 14** und **Si 18**) zeigt, gemessen in DMSO.

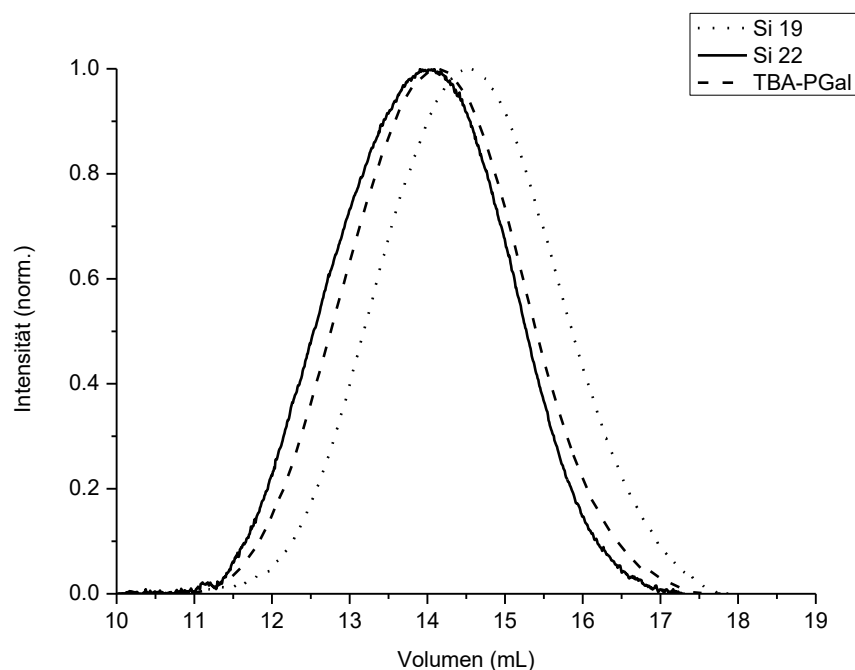


Abbildung 69: Größenausschlusschromatogramm, welches das Elutionsvolumen gegen die Signalintensität für Tetrabutylammoniumpolygalacturonat (TBA-PGal, als Referenzmaterial) und von zwei tert-Butyldimethylsilylpolygalacturonaten (tBDM-PGal, **Si 19** und **Si 22**) zeigt, gemessen in DMSO.

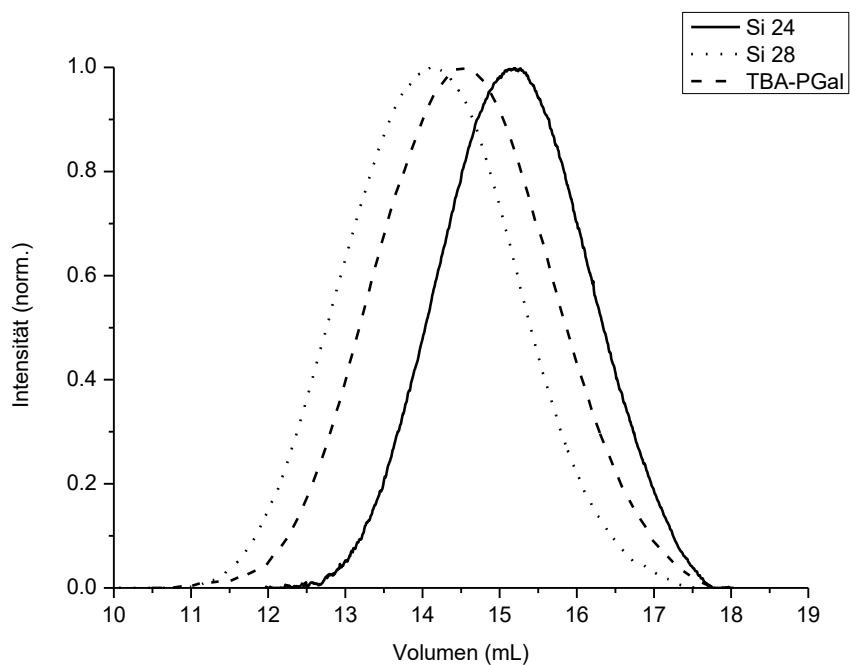


Abbildung 70: Größenausschlusschromatogramm, welches das Elutionsvolumen gegen die Signalintensität für Tetrabutylammoniumpolygalacturonat (TBA-PGal, als Referenzmaterial) und zwei Dimethylphenylsilylpolygalacturonate (DMP-PGal, **Si 23** und **Si 28**) zeigt, gemessen in DMSO.

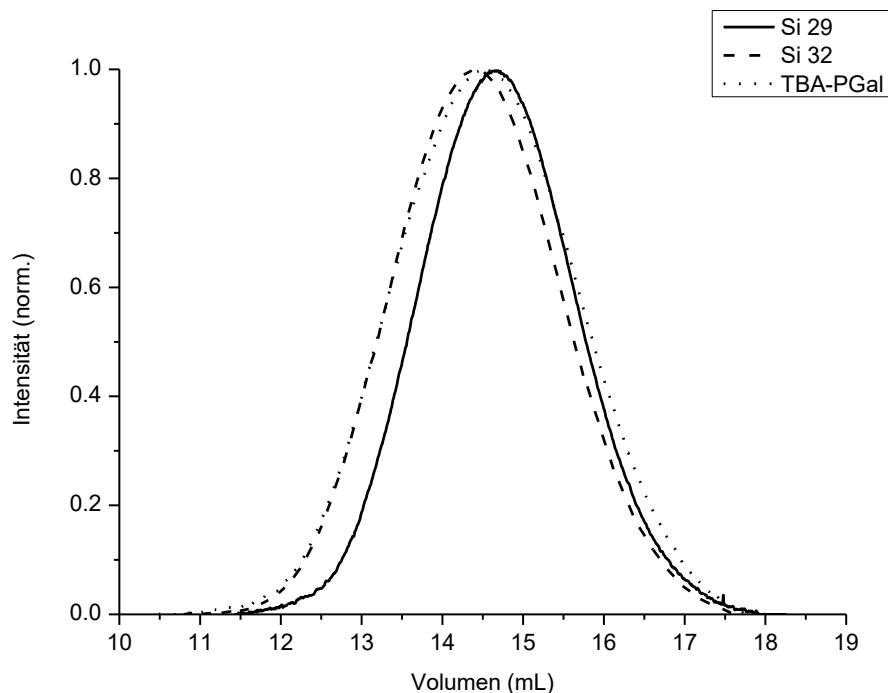


Abbildung 71: Größenausschlusschromatogramm, welches das Elutionsvolumen gegen die Signalintensität für Tetrabutylammoniumpolygalacturonat (TBA-PGal, als Referenzmaterial) und zwei Dimethylvinylsilylpolygalacturonate (DMVin-PGal, **Si 29** und **Si 32**) zeigt, gemessen in DMSO.

Die Untersuchungen zeigen, dass eine Reihe von kommerziell erhältlichen, substituierten Dimethylchlorsilanen mit Polygalacturonsäure in Formamid reagieren können. Imidazol dient hierbei als Base und Katalysator, wodurch die entsprechend silylierten Imidazoliumpolygalacturonate erhalten werden. Die Substituenten an den Dimethylchlorsilanen besitzen einen eindeutigen Einfluss auf das Reaktionsgeschehen. Dabei kommt es bei sterisch anspruchsvollen Substituenten zu keiner vollständigen Substitution, wobei bei den weniger sterisch anspruchsvollen Substituenten eine vollständige Substitution der Hydroxygruppen möglich ist, DMPSCI und DMVinCl mit einem DS von 2,0. Fraglich bleibt jedoch, warum die Umsetzung mit TMSCl nicht zu einer vollständigen Umsetzung führt. Eine vollständige Silylierung in Formamid kann mit TDSCl und tBDMCl nicht beobachtet werden. Die Grenze für die Reaktion liegt bei einem DS von 1,6 (für TDSCl) und 1,2 (für tBDMCl). Hierfür ist eindeutig der sterische Anspruch des verwendeten Substituenten verantwortlich. Die Löslichkeit der Verbindungen spiegelt ihren DS erkennbar wider. Bei niedrigem DS sind die Verbindungen stark durch ihren Salzcharakter geprägt und wasserlöslich. Diese Eigenschaft tritt mit zunehmendem DS in den Hintergrund. Die Materialien verlieren ihre

Wasserlöslichkeit und lösen sich in DMSO, jedoch bleibt die Löslichkeit auf nur dieses Lösungsmittel beschränkt.

3.4 Ionische Flüssigkeiten

Durch eine homogene Umsetzung kann es gelingen, den Grad und die Selektivität der Derivatisierung zu steuern. Diese Parameter sind unverzichtbar für die Entwicklung neuartiger, auf Biopolymeren basierender Materialien. Eine homogene chemische Modifizierung von PGalS in Wasser ist jedoch aufgrund der Hydrolyse feuchtigkeitsempfindlicher Reagenzien, die mit der Veresterungsreaktion des Biopolymers in Wasser konkurrieren, schwierig zu erreichen. Durch eine chemische Modifizierung lassen sich DMSO-lösliche Salze des Pektins herstellen, wie bereits in Abschnitt 3.1 und 3.3 gezeigt wurde, jedoch führt diese Derivatisierung zu einem zusätzlichen Prozessschritt.^[105,161] Um eine PS-Lösung zu erhalten, müssen die inter- und intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxygruppen des PS durch das Lösungsmittel aufgebrochen werden, was eine Solvation ermöglicht. Das Auflösen von ionischen PS ist noch schwieriger, da hier zusätzlich elektrostatische Wechselwirkungen berücksichtigt werden müssen. Als interessante Klasse von Lösungsmitteln gelten ionische Flüssigkeiten (IL). Neben anorganischen Vertretern der IL (Chloraluminat, Bromaluminat oder Übergangsmetallsalze) gelten die organischen Salze meist als "grüne" Lösungsmittel für das Auflösen von PS.^[272–275] Durch ihre Salzstruktur sollten Vertreter dieser Stoffklasse in der Lage sein, Pektine aufzulösen. In der Literatur wird berichtet, dass 1,3-Dialkylimidazoliumformiate unterschiedliche Polysaccharide, einschließlich Pektin, mit einer Konzentration von bis zu 3 Gew.-% löst.^[276] Das in der Studie eingesetzte Pektin wurde hinsichtlich seiner Struktur nicht charakterisiert, sodass keine Rückschlüsse auf das Löslichkeitsverhalten von Pektinen möglich waren. Als Grund für die Löslichkeit wurden die starken Wasserstoffbrückenbindungsfähigkeiten des eingesetzten IL angeführt. Die Struktur des Biopolymers nach dem Auflösen wurde jedoch nicht untersucht. Aufgrund dieser mangelnden Untersuchungen und der interessanten Eigenschaften von IL (niedriger Dampfdruck, Nichtentflammbarkeit, thermische und chemische Stabilität) wurde ihr Potenzial als nichtwässriges Medium für die Auflösung von PGalS studiert, wobei Polygalacturonsäure und 1-*n*-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid ausgewählt wurden.

3 Spezieller Teil

Es wurde herausgefunden, dass IL die PGaIS löst und dass die Auflösung mit einer Salzbildung zwischen IL und PGaIS einhergeht (Abbildung 72).

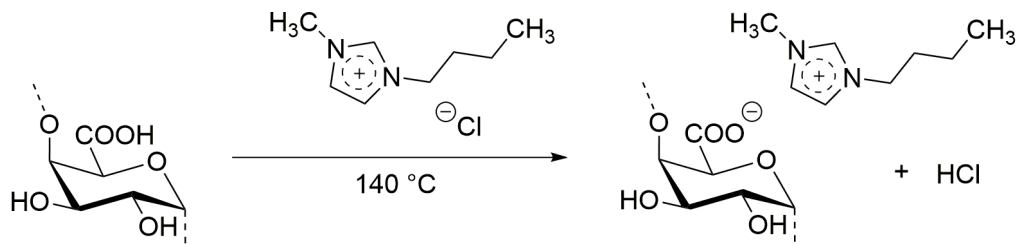


Abbildung 72: Schematische Darstellung der Auflösung von Polygalacturonsäure in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid bei 140 °C unter teilweiser Bildung des 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumsalzes.

In der Literatur wurden speziell synthetisierte, Formiat als Gegenion beinhaltende IL eingesetzt und das Lösungsvermögen des Pektins auf das Anion zurückgeführt.^[276] Weiter zeichnet sich das Chloridion gegenüber dem Formiat-Anion durch seine höhere chemische Stabilität aus. Das Auftreten von Nebenreaktionen während der Derivatisierung von PS in Acetat- oder Formiat-Gegenionen IL ist in der Literatur gut dokumentiert.^[198,277]

Um PGaIS in BMIMCl aufzulösen, wird die IL mit dem Polysaccharid gemischt und auf 80 °C erwärmt, wodurch die IL schmilzt. Es entsteht eine Suspension, die durch Anlegen eines Vakuums und Erhöhung der Temperatur auf 140 °C in eine klare Lösung von PGaIS überführt wird. Mit diesem einfachen Verfahren konnten bis zu 5,3 Gew.-% PGaIS in der IL gelöst werden. Die bräunliche Lösung ist klar und viskos (Abbildung 73).



Abbildung 73: Links: Geschmolzenes 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid bei 70 °C, Mitte: Salzsäuredetektion durch pH-Indikator, rechts: abgekühlte Lösung (70 °C) von PGaIS in der IL (S6).

Die Viskosität steigt durch Abkühlen auf Raumtemperatur an, wie es für eine Polymerlösung in IL zu erwarten ist. Die Temperaturabhängigkeit der Viskosität bei verschiedenen Konzentrationen wurde ebenfalls untersucht (Abbildung 74, Tabelle 9). Die Viskosität der

3 Spezieller Teil

Lösungen steigt mit zunehmender Menge an der gelösten PGaIS in der IL an, was auf einen Lösungsprozess und nicht auf ein einfaches Mischen der Komponenten hindeutet. Die spezifische Viskosität der unterkühlten IL beträgt bei 50 °C 2,2 Pa·s. Wobei eine 1,6 (**S 2**); 2,7 (**S 3**); 3,7 (**S 4**); 4,5 (**S 5**) und 5,3 (**S 6**) Gew.-%ige Lösung von PGaIS in der IL bei 50 °C Werte von 3,6; 14,8; 35,0; 46,2 von bis hin zu 71,8 Pa·s annehmen.

Tabelle 9: Spezifische Viskosität bei 50 °C und 70 °C von verschiedenen Polygalacturonsäure-Konzentrationen in 1-*n*-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid.

	IL ¹	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6
Masseanteil m%	0	1,64	2,70	3,74	4,46	5,26
Viskosität bei 50 °C [Pa·s]	2,20*	3,60*	14,8*	35,00*	46,20*	71,80*
Viskosität bei 70 °C [Pa·s]	0,60	0,30	3,80	7,00	8,74	15,30

¹ ionische Flüssigkeit; * spezifische Viskosität der unterkühlten IL

Während des AuflöSENS wird ein Gas freigesetzt, das sauer reagiert (Abbildung 73). Dabei handelt es sich um Chlorwasserstoff. Nach weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass die Säureform der Carboxygruppe der PGaIS zumindest teilweise in die Imidazoliumsalzform umgewandelt wird (Abbildung 72).

Die ¹H-NMR-Spektren von PGaIS (Abbildung 75a, in D₂O / NaOD) und von PGaIS nach Auflösung und Regenerierung aus BMIMCl (Abbildung 75b, in D₂O) unterscheiden sich signifikant. Neben den typischen Signalen der Wiederholungseinheit von PGaIS zwischen 5,5 und 4,0 ppm (Abbildung 75a) besitzt das Spektrum des regenerierten Polysaccharids zusätzlich Signale des 1-*n*-Butyl-3-methylimidazolium-Kations. Signale der Butylkette werden bei 4,44 ppm; 2,18 ppm; 1,67 ppm und 1,28 ppm beobachtet, die den CH₂- und CH₃-Einheiten zugeordnet werden können. Das Signal der Methylgruppe, die an dem anderen Ringstickstoffatom des Imidazols gebunden ist, kann bei 4,25 ppm gefunden werden, d.h. im Spektralbereich der AGaIE. Die Protonen des aromatischen Imidazolrings entsprechen den Signalen bei 7,82 ppm; 7,79 ppm und 9,02 ppm. Die Integration der Protonensignale des Imidazoliumpolygalacturonats zeigt, dass die Carbonsäurefunktionen teilweise in das Imidazoliumsalz umgewandelt wurden, etwa 50 % der Gruppen sind in dieser Salzform vorhanden.

3 Spezieller Teil

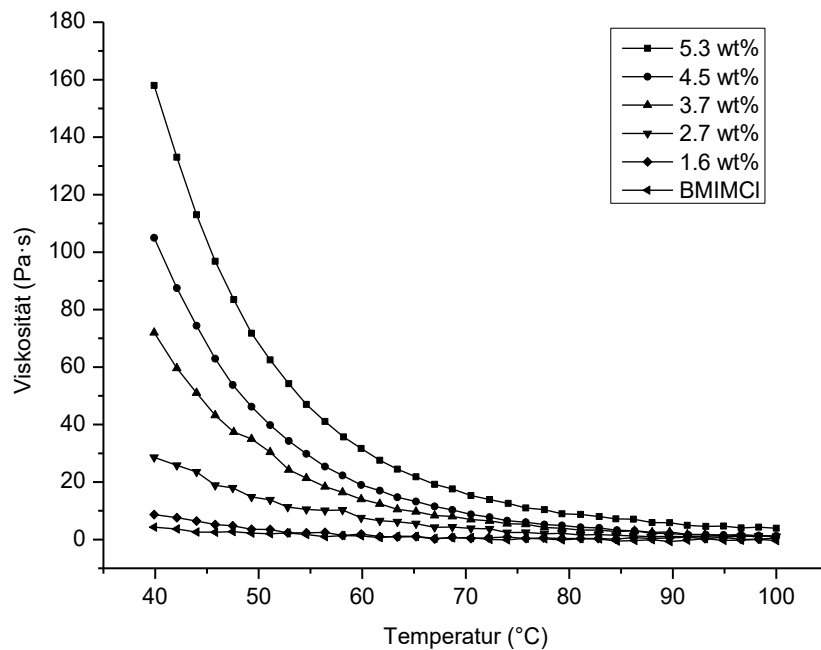


Abbildung 74: Temperaturabhängiger Viskositätsverlauf von 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (BMIMCl) und verschiedenen Konzentrationen der in BMIMCl gelösten Polygalacturonsäure.

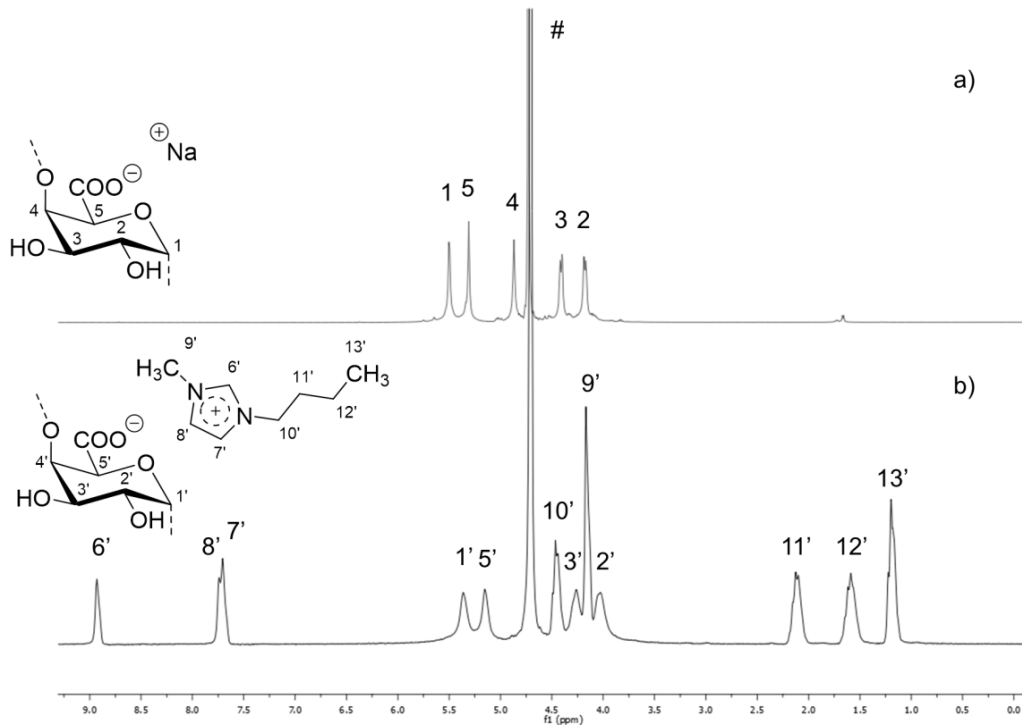


Abbildung 75: ^1H -NMR-Spektren von a) Natriumpolygalacturonat (erhalten durch Auflösung der Polygalacturonsäure in D_2O / NaOD) und b) 1-n-Butyl-3-methylimidazolium-Polygalacturonat (regeneriert aus dem gelösten Zustand in D_2O).

Die Ergebnisse konnten durch FTIR-Spektroskopie bestätigt werden. Die Spektren von PGaIS, deren Natriumsalz und dem BMIM-Polygalacturonat, das durch Regenerierung unter Verwendung von Dialyse und Lyophilisierung erhalten wurde, sind in Abbildung 76 dargestellt. Die Valenzschwingungen der COO-Einheiten sind hierbei von Interesse. Für PGaIS zeigt das Spektrum ein Signal, das der Säureform bei 1742 cm^{-1} entspricht (Abbildung 76a), während das Signal für die Carboxylatform des Natriumsalzes bei 1620 cm^{-1} liegt (Abbildung 76b). Für die gelöste und regenerierte PGaIS treten zwei unterschiedliche Signale auf, entsprechend der Carbonsäure- und der Imidazoliumsalzform (Abbildung 76c).

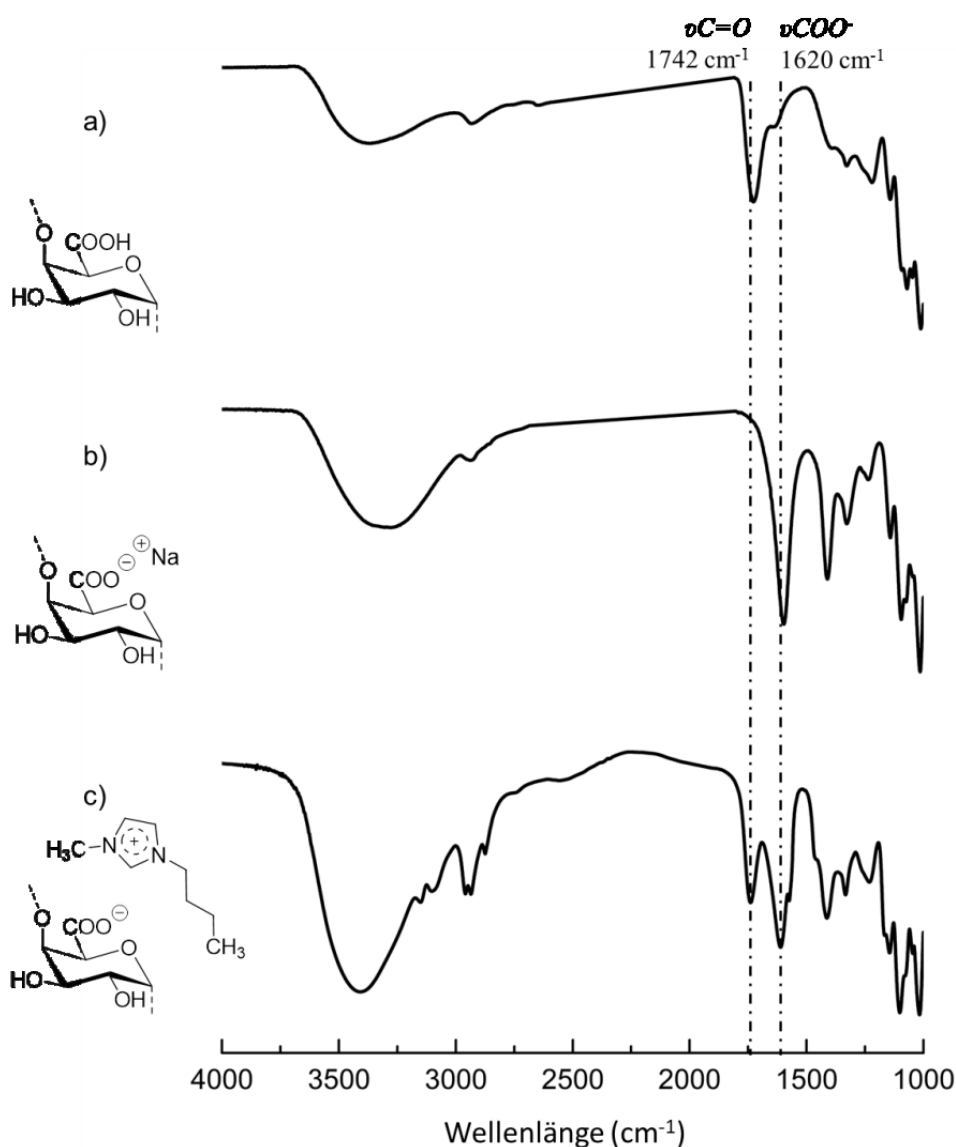


Abbildung 76: FTIR-Spektren von a) Polygalacturonsäure (PGaIS), b) Natriumpolygalacturonat und von c) 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumpolygalacturonat (erhalten durch Lösen von PGaIS in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid und Regenerierung).

3 Spezieller Teil

Die Polysaccharidderivate wurden durch Größenausschlusschromatographie analysiert (Abbildung 77). Um vergleichbare Ergebnisse für die GPC zu erhalten, wurden die 1-*n*-Butyl-3-methylimidazolium-Polygalacturonate einem Ionenaustausch unterzogen, was zur Bildung der Natriumform der Derivate und damit zu gleichen Strukturen führte. Das Zahlenmittel der Molmassen (M_n) der Polygalacturonate nimmt mit zunehmender Auflösungstemperatur ab (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zahlenmittel der Molmasse (M_n) und Polymerisationsgrad (DP) von Natriumpolygalacturonat (25 °C) und Polygalacturonsäure, behandelt bei 80 °C und gelöst bei 140 °C in 1-*n*-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid.

PGalS	25 °C	80 °C	140 °C
M_n [g·mol ⁻¹]	52 281	46 775	44 520
DP	264	236	225

Natriumpolygalacturonat (bei Raumtemperatur) besitzt ein M_n von 52.281 g·mol⁻¹. Die bei 80 °C behandelten und bei 140 °C gelösten Proben besitzen nach der Regeneration und Umwandlung in die Natriumform eine M_n von 46.775 g·mol⁻¹ bzw. 44.520 g·mol⁻¹. Die Wärmebehandlung führt zu einem geringen Abbau der Polygalacturonsäure. Der durchschnittliche Polymerisationsgrad (DP) beträgt demgemäß 264 bei 25 °C auf 225 bei 140 °C. Dieser Polymerabbau ist für Polysaccharide bekannt, ist jedoch nicht die treibende Kraft für die Auflösung von PGalS, wenn man bedenkt, dass der DP des regenerierten Materials immer noch 85 % des Ausgangsmaterials erreicht.^[278,279]

Das Röntgenbeugungsdiagramm von der ursprünglichen PGalS, der regenerierten PGalS und 1-*n*-Butyl-3-methylimidazolium-polygalacturonat ist in Abbildung 78 gezeigt. Das Beugungsmuster der ursprünglichen PGalS zeigt zwei breite 2 θ -Signale bei 10,9 ° und 19,2 °. Diese konnten ebenfalls bei der regenerierten PGalS gefunden werden. Das Beugungsmuster für das 1-*n*-Butyl-3-methylimidazolium-Polygalacturonat besitzt im Vergleich zu den anderen Mustern eine signifikante Signalabnahme für das 2 θ -Maximum bei 10,4 °.

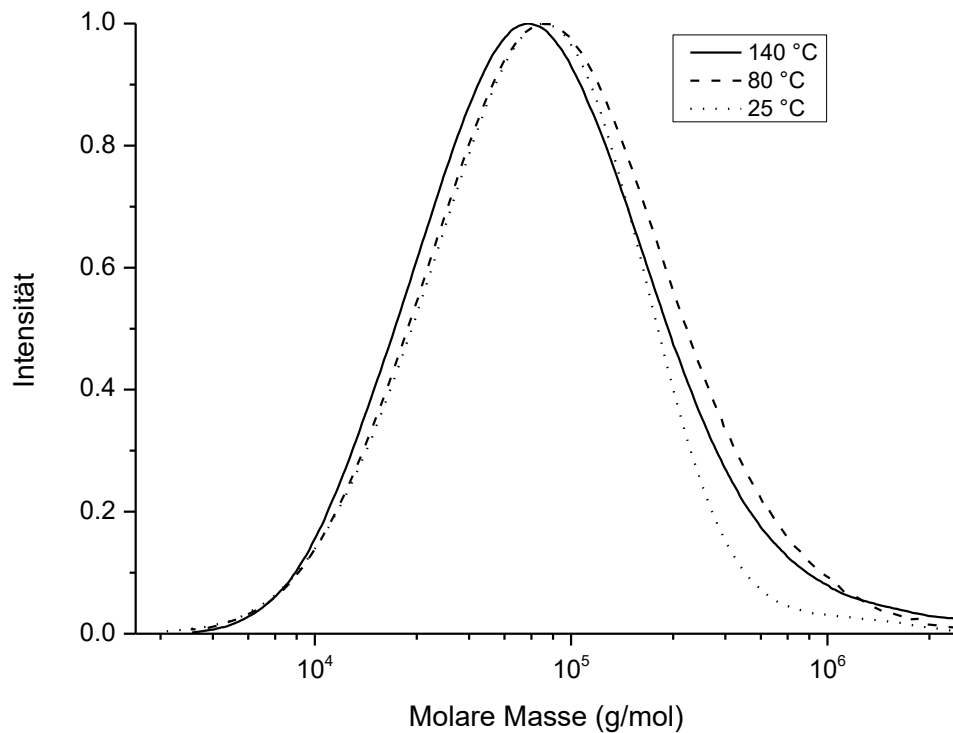


Abbildung 77: Größenausschlusschromatographie in Wasser von Natriumpolygalacturonat (25 °C) und Polygalacturonsäure, behandelt bei 80 °C und gelöst bei 140 °C in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid, regeneriert und in das Natriumsalz umgewandelt.

Im Röntgenbeugungsdiagramm ist deutlich zu erkennen, dass bereits das Ausgangsmaterial keine hohe Kristallinität aufweist und die Struktur sich durch den Löseprozess nicht signifikant ändert. Interessant ist hierbei, dass in der Literatur XRD-Spektren von Pektin publiziert wurden, die einen hohen Grad an Kristallinität zeigen (*Mishra et al.*).^[216] Jedoch wurde durch die Autoren keine eingehende Polymercharakterisierung durchgeführt, was eine Vergleichbarkeit mit den hier gewonnenen Erkenntnissen verhindert.

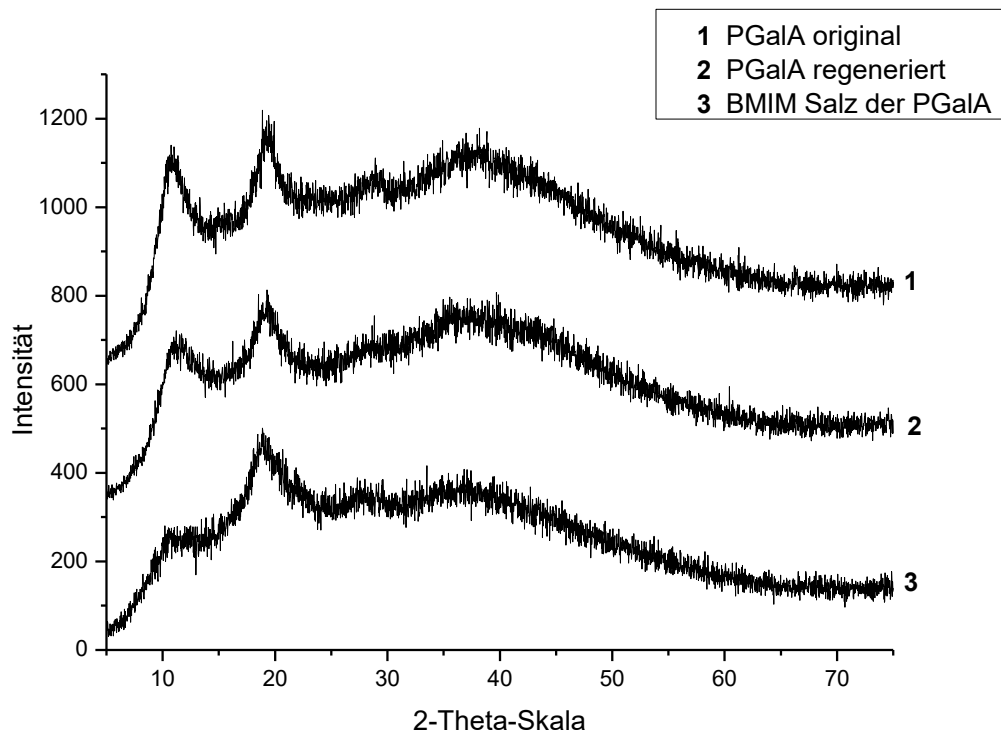


Abbildung 78: Röntgenbeugungsdiagramm von Polygalacturonsäure vor (1) und nach (2) dem Auflösen und Regenerieren. Das Muster der 1-*n*-Butyl-3-methylimidazolium (BMIM) -Salzform von PGalS (3), die während des Auflösens gebildet wird, ist ebenfalls gezeigt.

Als Lösungsmittel muss die IL mit intramolekularen und vor allem intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen des PS interagieren. Aus der Cellulosechemie ist bekannt, dass beim Auflösen dieses PS in ILs und organischen Lösungsmittel-Salzgemischen wie Dimethylsulfoxid/Tetrabutylammoniumfluorid oder *N,N*-Dimethylacetamid (DMAc) / LiCl, Anionen wie Fluorid und Chlorid eine entscheidende Rolle spielen.^[199,280] Diese Anionen haben bekanntermaßen wasserstoffbrückenbrechende Eigenschaften und können sich so zwischen Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen den Polymerketten vorliegen, einschieben (Abbildung 79).

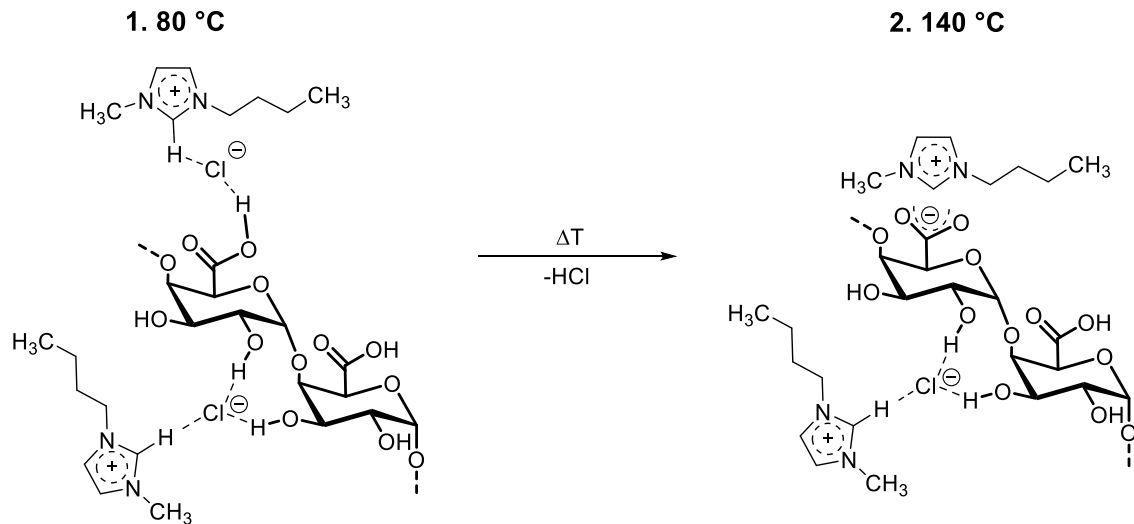


Abbildung 79: Wechselwirkung von 1-*n*-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid mit Polygalacturonsäure (PGaLS). Die Wasserstoffbrückenbindung befindet sich innerhalb der PGaLS-Kette. 1. Chloridionen interagieren mit den vorhandenen Wasserstoffatomen der Hydroxylfunktionen. Dadurch werden intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen. 2. Bildung der Carboxylatform von PGaLS und Freisetzung von Chlorwasserstoff.

Diese Wechselwirkung der Chloridionen kann als ein wesentlicher Schritt des Auflösungsprozesses angesehen werden, der durch moderate Hitze (80 °C) aktiviert wird. Durch Anlegen von Vakuum und weitere Erhöhung der Temperatur auf 140 °C führt die Freisetzung von Chlorwasserstoff zur Bildung der Polygalacturonsäuresalzform mit dem Imidazoliumkation als Gegenion. Dieses sterisch anspruchsvolle Gegenion verbessert die Löslichkeit des PS weiter. Die Tatsache, dass etwa 50 % der Carbonsäuren in die Salzform umgewandelt werden, kann durch die polyelektrolytische Natur des Materials erklärt werden. Einerseits benötigen die großen Kationen Platz, um elektrostatische Interaktionen miteinander zu vermeiden. Auf der anderen Seite sind sie an ihr Carboxylat-Gegenstück gebunden, können daher die Umgebung des Polymergerüsts nicht verlassen und schirmen benachbarte Carbonsäuregruppen sterisch ab, wodurch ein weiterer Angriff der IL verhindert wird.

Somit lässt sich sagen, dass PGaLS bei erhöhter Temperatur in BMIMCl löslich ist und dieser Lösevorgang mit nur geringem PS-Abbau einhergeht. Es konnte eine Lösung mit einer Konzentration von bis zu 5,3 Gew.-% erhalten werden, was 60 % mehr sind als bisher in der Literatur beschreiben worden ist.^[276] Die Wechselwirkung der Chloridionen des Lösungsmittels mit den Wasserstoffbrückenbindungen des Polymers unterstützt den Auflösungsprozess. Die anschließende Bildung der Imidazoliumsalzform des Polymers ist der Schlüsselschritt für die Auflösung. Die Strukturveränderungen wurden durch NMR- und IR-

3 Spezieller Teil

Spektroskopie nachgewiesen. XRD-Messungen zeigten eine deutliche Änderung der Reihenfolge der Polymerstruktur, die aus dieser Salzbildung resultiert. Diese Ergebnisse haben das Verständnis des Auflösungsprozesses von PGaIS, der für eine homogene chemische Modifizierung des Polymers entscheidend ist, erheblich verbessert.

BMIMCl sollte als Lösungsmittel für Derivatisierungen an der PGaIS untersucht werden. Dafür wurde die, zuvor in Formamid, durchgeführte Umsetzung von PGaIS mit FITC in BMIMCl studiert. PGaIS wurde in BMIMCl nach dem beschriebenen Muster gelöst und anschließend bei 80 °C mit FITC versetzt. Es zeigte sich, dass Polygalacturonsäure in BMIMCl bei 80 °C mit FITC zum entsprechenden Thiocarbamat umgesetzt werden kann (Abbildung 80). Der Massenanteil an polysaccharidgebundenem Farbstoff variiert hierbei zwischen 5,09 m% bis hin zu 9,18 m% (Tabelle 11). Die eingesetzten Äquivalente und Reaktionszeiten waren identisch zu denen der in Formamid bei 80 °C genutzten Parameter.

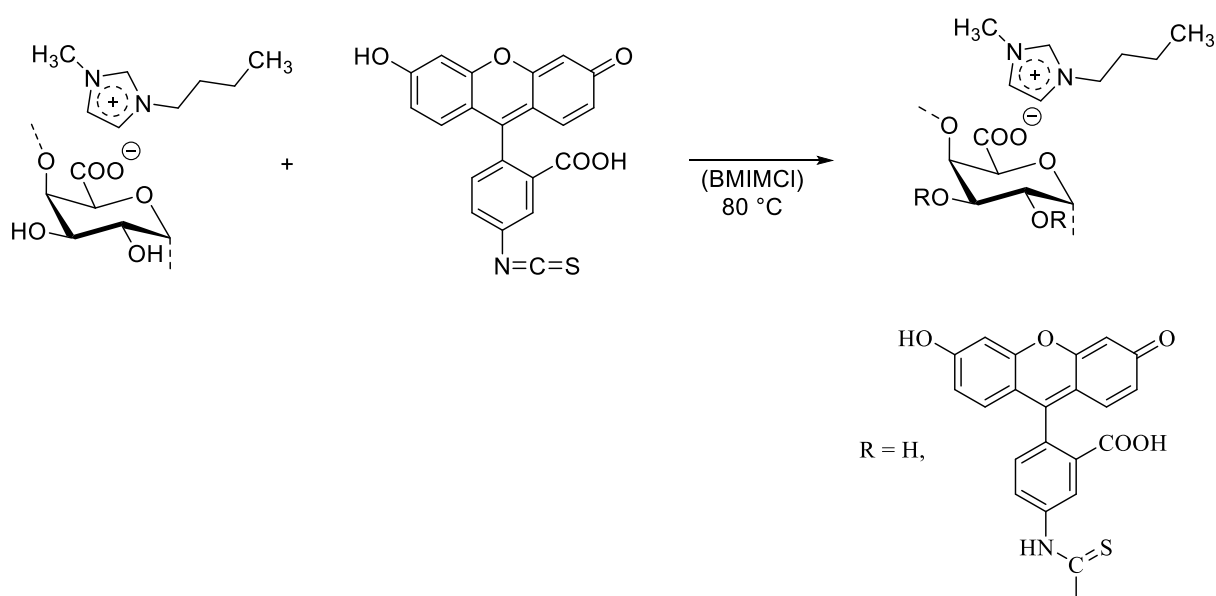


Abbildung 80: Syntheschema zur Anbindung von Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) an Polygalacturonsäure (PGaIS) bei 80 °C in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (BMIMCl).

Zur Reinigung der Produkte wurde das Material mehrfach in Isopropyl-Äthanol gefällt und gewaschen. Hierbei war bereits zu erkennen, dass das Fällmedium nur geringste Mengen FITC aufwies. Im Anschluss wurden die Derivate in deionisiertem Wasser gelöst, dialysiert und gefriergetrocknet. Die Bestimmung der Massenprozentage an polysaccharidgebundenem Farbstoff in den gereinigten Proben erfolgte über UV-Vis-Messungen (Abbildung 42, Tabelle 11).

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen für die Fluoreszenzmarkierung von Polygalacturonsäure in 1-n-Butyl-3-methylimidazolium (BMIM), bei 18 h Reaktionszeit.

Reaktionsbedingungen		Produkt	
Moläquivalente FITC Äquiv.	Temperatur [°C]	Probe	m%
0,03	80	F 5	5,09
0,06	80	F 6	9,18

m% = Masseprozent an gebundenen Farbstoff; FITC = Fluoresceinisothiocyanat "Isomer I"

Bei den erhaltenen Proben konnte somit eine Umsetzung von 81 % FITC bei **F 5** und 79 % bei **F 6** erzielt werden. Dies ist eine Effizienzsteigerung um den Faktor 4, im Vergleich zur Reaktion in Formamid. Diese homogene Umsetzung von PGaIS in BMIMCl erlaubt eine effiziente Derivatisierung von polyelektrolytischen Polysacchariden. Für die Umsetzung wurde kein zusätzlicher Katalysator, wie beispielsweise Pyridin, zum Reaktionsgemisch zugegeben. Das lässt den Schluss zu, dass die ionische Flüssigkeit selbst einen katalytischen Effekt auf die Reaktion von PGaIS mit Isothiocyanat ausübt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL für das Lösen von PGaIS gut geeignet sind. Der Lösevorgang verläuft schnell und mit geringem Polymerabbau.

3.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur chemischen Modifizierung von Polygalacturonsäure (PGaIS) durchgeführt, die als vollständig deacetylierte Form das Polysaccharid Pektin repräsentiert. Die deacetylierten Wiederholungseinheiten des Pektins sind für die ionotrope Gelbildung und die Eigenschaften der Gele essentielle Bausteine des Biopolymers. Die betrachteten Umsetzungen umfassen Acetylierungen, Silylierungen und die Bildung von Thiocarbamaten des Polysaccharids.

Ziel der Arbeit war es, PGaIS mit hydrophoben Gruppen auszustatten, um damit die Eigenschaften der ionotropen Gele steuern zu können. Durch die Acylierungsreaktionen erhaltene Derivate waren bei Werten des durchschnittlichen Substitutionsgrades (DS) < 0,3 wasserlöslich und bildeten Gele, welche jedoch bei DS-Werten über 0,3 instabil sind. Die

3 Spezieller Teil

Trimethylsilylierung von Polygalacturonsäure wurde in Formamid als Reaktionsmedium bei erhöhter Temperatur unter Verwendung von 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS) oder Trimethylsilylchlorid (TMSCl) in Kombination mit Imidazol untersucht. Die erhaltenen Produkte wurden durch Größenausschlusschromatographie, NMR- und IR-Spektroskopie charakterisiert. In Bezug auf den DS ist HMDS im Vergleich zu TMS / Imidazol ein reaktiveres Silylierungsreagenz. Produkte mit DS-Werten von 0,6 wurden mit TMSCl erhalten, während HMDS Produkte mit DS von bis zu 1,8 ergab. Beide Reagenzien führen jedoch zur Bildung von Nebenprodukten. Im Fall von HMDS kommt es zur Bildung einer Amidgruppe, wodurch die Carbonsäure am Polymergrundgerüst für weitere Transformationen deaktiviert wird. Bei der Verwendung von TMSCl kommt es zur Vernetzung der Polymerketten, was die Molmassen der erhaltenen Produkte beeinflusst. Alle erhaltenen TMS-Pektine sind wasserlöslich, wobei in wässriger Lösung eine schnelle Hydrolyse der Substituenten beobachtet wurde. Die Silylierungsversuche mit sterisch anspruchsvolleren Reagenzien (*tert*-Butyldimethylsilyl- (tBDM), *tert*-Hexyldimethylsilyl- (TDS), Dimethylphenylsilyl- (DMPS) und Dimethylvinylsilylgruppen (DMVin)) in Formamid als Reaktionsmedium lieferten teilweise vollständig substituierte Pektinderivate. Die Reagenzien mit den sterisch anspruchsvolleren Gruppen tBDM und TDS ergaben Produkte mit DS-Werte von 1,2 und 1,4. Die mit DMPS- und DMVin-Gruppen silylierten PGaIs wiesen DS-Werte von 2,0 und 1,8 auf. Diese Derivate verloren jedoch bei zunehmendem DS ihre Wasserlöslichkeit: tBDM- und TDS-PGal ließen sich ab einem DS von ca. 0,8, die DMPS- und DMVin-Derivate ab einem DS von ca. 1,1 nicht mehr in Wasser lösen. Nach dem Überschreiten der Wasserlöslichkeitsgrenze waren alle vier Derivate in DMSO löslich und die vollständig substituierte DMPS-PGaIs zudem sogar in Chloroform löslich.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Umsetzung von PGaIs mit einem Isothiocyanat durchgeführt, um ein fluoreszenzmarkiertes, gelbildendes Derivat zu erhalten, das zur Untersuchung der Gelbildung an Metalloberflächen eingesetzt werden kann. Fluoreszeinisothiocyanat ließ sich durch homogene Umsetzung in Formamid an das Biopolymer binden. Das erhaltene PGaIs-Derivat erlaubt vertiefende Studien zur Gelbildung durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die PGaIs an der Metalloberfläche anreichert, was mit einer Gelbildung einhergeht.

3 Spezieller Teil

Die Schwierigkeiten bei der homogenen Umsetzung von PGaIS (und Pektinen), die aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit in wenigen, teilweise reaktiven Lösungsmitteln resultieren, wurden zum Anlass genommen, die Löslichkeit und eine homogene Derivatisierbarkeit von PGaIS in ionischen Flüssigkeiten als alternative Lösungsmittel zu untersuchen.

Es wurde herausgefunden, dass die ionische Flüssigkeit 1-*n*-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (BMIMCl) ein nichtwässriges Lösungsmittel für die schnelle und effiziente Auflösung von Polygalacturonsäure ist. Bis zu 5,3 Gew.-% Biopolymer konnten durch Erhitzen der Mischung aus Biopolymer/BMIMCl auf 140 °C gelöst werden. Etwa 50 % der Polygalacturonsäuregruppen bilden bei erhöhter Temperatur mit dem Lösungsmittel das entsprechende Imidazoliumsalz; dies führt zur Löslichkeit des Biopolymers im Überschuss von BMIMCl. Die Salzbildung wurde mittels NMR- und FTIR-Spektroskopie sowie durch Röntgenbeugung (XRD) untersucht und ist eine treibende Kraft für die Auflösung des Biopolymers. Bei der Umsetzung der gelösten PGaIS mit FITC zeigte sich die effiziente Bildung des Thiocarbamates. Durch die Umsetzung in BMIMCl konnten bis zu 81 % Reagenzausbeute (FITC) erzielt werden, was einer Effizienzsteigerung um den Faktor 4 entspricht (im Vergleich zur Reaktion in Formamid).

Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern neue Ansatzpunkte für weiterführende Arbeiten auf dem Gebiet der Pektinchemie. Um den aktuellen global-ökologischen Veränderungen entgegen zu wirken, werden Polysaccharide wie Pektin in Zukunft noch stärker an industrieller Bedeutung gewinnen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien

Die Veresterungsgrade der Pektine (Sigma Aldrich) P9 (DM von 0,1) und P7 (DM von 0,3) wurden titrimetrisch bestimmt. Polygalacturonsäure (Sigma Aldrich) hatte einen Gehalt an Galacturonsäure $\geq 90\%$ (enzymatisch) und $M_n = 56 - 905 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (GPC), Polymerisationsgrad (DP) = 330. Das Biopolymer wurde im Vakuum bei 100°C für 2 h getrocknet vor Gebrauch. Formamid (Reinheit $\geq 99,0\%$, Wassergehalt $\leq 0,3\%$, bestimmt durch Karl-Fischer-Titration), 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (BMIMCl, Reinheit $\geq 99,0\%$ nach HPLC; $\leq 0,2\%$ Wasser, $T_m = 65^\circ\text{C}$) wurde von Sigma Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Alle anderen Reagenzien, wie Essigsäureanhydrid, Acetylchlorid, Fluoresceinisothiocyanat "Isomer I", Phenylisothiocyanat, Trimethylsilylchlorid (TMSCl), 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS), Terthexydimethylchlorsilan (TDSCI), *tert*-Butyldimethylchlorsilan (tBDMCl), Dimethylvinylchlorsilan (DMVinCl), Dimethylphenylchlorsilan (DMPSCI) waren analysenrein und wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

4.2 Methoden

4.2.1 Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR) -Spektroskopie

Die FTIR-Spektren wurden auf einem NICOLET AVATAR 370 DTG-Spektrometer (KBr-Technik) aufgenommen. Die Proben wurden im Bereich von $4000 \text{ cm}^{-1} - 400 \text{ cm}^{-1}$ mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} gescannt.

4.2.2 Kernspinresonanz (NMR) -Spektroskopie

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 250 MHz-Spektrometer (250 oder 62,5 MHz), sowie mit einem Bruker Avance 400 MHz-Spektrometer (400 oder 100 MHz) aufgenommen. Die Probenkonzentration betrug mindestens $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die Proben wurden in Abhängigkeit von der Löslichkeit in D_2O , einer Mischung aus D_2O / NaOD oder

4 Experimenteller Teil

DMSO-d₆ gelöst. Die Spektren wurden an den Resonanzsignalen des Lösungsmittels kalibriert.

4.2.3 Größenausschlusschromatographie (GPC)

Die GPC wurden mit einer LC-Ausrüstung der Agilent 1200-Serie (GPC-Pumpe G1310A, RI-Detektor G1362A, Säulen: PSS Gram30 und PSS Gram1000 in Reihe, Flussrate: 1 mL · min⁻¹; Elutionsmittel für wasserlösliche Proben: H₂O / 0,1 M NaNO₃) durchgeführt / 0,05 % NaN₃. Die Kalibrierung wurde mit Pullulan-Standards durchgeführt. Für die Messung der TMS-Proben wurden diese für 24 Stunden vor der Messung hydrolysiert, um eine vollständige Hydrolyse der TMS-Gruppen sicherzustellen.

4.2.4 Rheologie

Die Rheologieexperimente wurden an einem Physica UDS 200 mit Kegel-Platte-Geometrie, bei einer Temperatur von 40 bis 100 °C innerhalb von ± 0,3 °C unter Verwendung eines zirkulierenden Thermobads mit einer Heizflüssigkeit durchgeführt. Im „Controlled Rate“ Modus variierten die Scherraten von 0,1 – 1000 s⁻¹, im „Controlled Stress“ Modus wurden Schubspannungen von 0,05 – 50 Pa vorgegeben. Die Messung erfolgte in einem Zyklus ansteigender und abnehmender Scherraten bzw. Schubspannungen, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und Thixotropie auszuschließen. Die Scherströmungsexperimente wurden mit 3 mL der Probe durchgeführt. Die von der Schergeschwindigkeit abhängige Viskosität wurde bei verschiedenen Temperaturen gemessen.

4.2.5 Röntgenbeugung (XRD)

Röntgenbeugungsuntersuchungen der Ausgangsstoffe und der Produkte wurden mit Cu K_α-Strahlung durchgeführt, die bei 40 kV und 40 mA erzeugt wurde (XRD-PW 1700, Philips, USA). Die Proben wurden im 2θ-Bereich von 10–70 gescannt.

4.2.6 Elementaranalyse

Die Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffanalysen wurden mit einem LECO CHNS-932 durchgeführt. Die berechneten und gefundenen Werte wurden in Masseprozent angegeben.

4.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluorszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die Proben entweder auf einen Objektträger oder auf ein Stahlblech (GARDOBOND CRS) aufgetragen und direkt im Anschluss in flüssigen Stickstoff getaucht, die Probenköpern wurden daraufhin lyophilisiert. Die Untersuchungen wurden mit einem LSM 510 META (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena), mit einer kombinierten Laser-Diode 405 (405 nm, Lasos Lasertechnik GmbH) Argon/2 (458/477/488/514 nm) durchgeführt. Die favorisierte Anregungswellenlänge betrug $\lambda_{\text{Anregung}}$ 488 nm.

4.2.8 Siliziumbestimmung (gravimetrisch)

Die zu messende Probe wurde für einen Tag bei 105 °C getrocknet. Es wurden 90 mg mit 2 mL konz. Schwefelsäure versetzt und für einen Tag im Exsikator gelagert. Anschließend wurde die Schwefelsäure abgeraucht und der Tiegel ausgeglüht, bis der Rückstand eine rein weiße Farbe aufzeigte. Aus der Einwaage der Probe und der Masse des entstandenen SiO₂ wurde der prozentuale Gehalt an SiO₂ berechnet.

4.3 Allgemeine Synthesevorschriften

4.3.1 Vorbehandlung der Pektine – Entaschen & Umsalzung

Entaschen der Pektinproben:

Zu 5,35 g Pektin (CP 9, CP 7), suspendiert in 300 mL eines Ethanol-Wassergemisches (1:1), werden 5 mL HCl (37%ig) zugegeben und die Mischung mit einem Dispergiergerät für 1 min homogenisiert. Anschließend wird für weitere 15 min mit einem Magnetrührer gerührt. Die Mischung wird auf einer Glasfilternutsche filtriert und der Rückstand mit einem Ethanol-

4 Experimenteller Teil

Wassergemisch (3:1) digeriert, bis die Waschlösung chloridfrei ist. Die Abwesenheit von Chloridionen wird mit Hilfe einer 0,1 M AgNO_3 -Lösung geprüft. Der gesamte Vorgang wird zwei Mal durchgeführt. Das so erhaltene Produkt wird bei 40 °C im Vakuum bis zur Massekonstanz getrocknet.

Umsalzen der Pektinproben und Polygalacturonsäure (Kationenaustausch):

Das entaschte Pektin (2,50 g) wird in 100 mL eines Isopropanol-Wassergemischs (3:1) dispergiert und langsam mit Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung (TBA-OH) neutralisiert, wobei ein signifikanter Viskositätsanstieg durch das Auflösen des Polymers beobachtet werden kann. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer von Isopropanol und einem Teil des Wassers befreit. Die verbleibende hochviskose Lösung wird eingefroren und lyophilisiert. Ausbeute: 4,95 g TBA-PGal.

4.3.2 Acetylierung von Pektin mit Essigsäureanhydrid

3,47 g (19,70 mmol) des aus 4.3.1 entaschten CP9 werden in 90 mL Formamid suspendiert und unter mechanischem Rühren bei 90 °C für 0,5 h erhitzt, wobei das Pektin in Lösung geht. Nach dem Lösevorgang wird auf 50 °C abgekühlt, 30 mL Pyridin (trocken über Molsieb) zugesetzt und 0,5 h nachgerührt. Im Anschluss werden langsam 9,3 mL (98,51 mmol) Essigsäureanhydrid zugetropft und weitere 5 h bei 50 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch in 1 L Methanol gefällt, filtriert und der Feststoff drei Mal mit 200 mL Methanol gewaschen. Der Feststoff wird in 100 mL entionisiertem Wasser gelöst und erneut in Methanol gefällt, anschließend zwei Mal mit Methanol und zwei Mal mit Aceton, jeweils 200 mL, gewaschen. Das Produkt wird im Vakuum bis zur Massekonstanz getrocknet.

Ausbeute: 2,90 g (**Ac 13**, 16,47 mmol, 84 %, DS = 0,4).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O) δ : 2,50 (3H, $-\text{CH}_3$), 3,5 - 5,5 ppm (5H, AGE).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, D_2O) δ : 20,9 (Acetat- CH_3), 53,4 (O- CH_3), 68,8-71,3 (C2,3,5), 78,7 (C4), 100,0 (C1), 173,7 ppm (C=O).

4.3.3 Acetylierung von Polygalacturonsäure mit Essigsäureanhydrid

3,50 g (19,87 mmol) Polygalacturonsäure werden in 60 mL Formamid suspendiert und unter Rühren bei 95 °C für 0,5 h erhitzt, wobei die Viskosität steigt und Polygalacturonsäure in Lösung geht. Zu der auf 50 °C abgekühlten Lösung werden 30 mL Pyridin (trocken über Molsieb) zugesetzt und 0,5 h nachgerührt. Anschließend werden 9,4 mL (99,35 mmol) Essigsäureanhydrid langsam in die Reaktionsmischung getropft und 5 h bei 50 °C gerührt. Kolbeninhalt wird in 1 L Methanol gefällt, filtriert und anschließend drei Mal mit 200 mL Methanol gewaschen. Der Feststoff wird anschließend in 50 mL entionisiertem Wasser gelöst und in 200 mL Methanol umgefällt, mit 200 mL Methanol und zwei Mal mit 200 mL Aceton gewaschen und für 12 h im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,1 g (**Ac 17**, 17,66 mmol, 90 %, DS = 0,3).

¹H-NMR (250 MHz, D₂O) δ : 2,50 (3H, -CH₃), 3,5 - 5,5 ppm (5H, AGE).

¹³C-NMR (62,5 MHz, D₂O) δ : 20,9 (Acetat-CH₃), 65,8-73,3 (C2,3,5), 78,8 (C4), 101,0 (C1), 174,7 ppm (C=O).

4.3.4 Acetylierung von Polygalacturonsäure mit Acetylchlorid

3,54 g (20,10 mmol) Polygalacturonsäure werden in 80 mL Formamid suspendiert und unter Rühren bei 95 °C für 0,5 h erhitzt, wobei Polygalacturonsäure in Lösung geht. Die Lösung wird auf 50 °C abgekühlt und es werden 20 mL Pyridin (trocken über Molsieb) zugesetzt und 0,5 h gerührt. Nun werden 14,3 mL (201,00 mmol) Acetylchlorid langsam in die Reaktionsmischung getropft und 5 h bei 50 °C gerührt. Der Inhalt des Kolbens wird in 1 L Methanol gefällt, filtriert und anschließend drei Mal mit 150 mL Methanol gewaschen und für 12 h im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,24 g (**Ac 23**, 18,44 mmol, 94 %, DS = 0,8).

¹H-NMR (250 MHz, D₂O) δ : 2,45 (3H, Acetat-CH₃), 3,5 – 5,5 ppm (5H, AGE).

¹³C-NMR (62,5 MHz, D₂O) δ : 21,1 (Acetat-CH₃), 67,9-72,4 (C2,3,5), 78,8 (C4), 100,2 (C1), 175,3 ppm (C=O).

4.3.5 Acetylierung von Polygalacturonsäure mit Essigsäurevinylester

3,54 g (19,59 mmol) Polygalacturonsäure werden in 80 mL Formamid suspendiert und unter Rühren bei 95 °C erhitzt, wobei Polygalacturonsäure in Lösung geht. Die Lösung wird auf 40 °C abgekühlt und es werden 20 mL Pyridin (trocken über Molsieb) zugesetzt und nach weiteren 0,5 h 9,0 mL (97,94 mmol) Essigsäurevinylester langsam in die Reaktionsmischung getropft. Das Gemisch wird für 5 h bei 50 °C gerührt, anschließend wird der Kolbeninhalt in 1 L Methanol gefällt, filtriert und der Filtrerrückstand drei Mal mit 200 mL Methanol gewaschen. Die Trocknung erfolgt bei 50 °C im Vakuum bis zur Massekonstanz.

Asubeute: 2,62 g (**Ac 29**, 18,44 mmol, 76 %, DS = 0,1).

¹H-NMR (250 MHz, D₂O) δ: 2,42 (3H, Acetat-CH₃), 3,5 – 5,5 ppm (5H, AGE).

¹³C-NMR (62,5 MHz, D₂O) δ: 20,9 (Acetat-CH₃), 67,6-72,2 (C2,3,5), 78,6 (C4), 100,4 (C1), 175,5 ppm (C=O).

4.3.6 Thiocarbamidierung von Polygalacturonsäure in Formamid

1,01 g (5,73 mmol) Polygalacturonsäure werden in 30 mL Formamid suspendiert und unter Rühren bei 95 °C erhitzt, wobei Polygalacturonsäure in Lösung geht. In die auf 40 °C abgekühlte Lösung werden 134,0 mg (0,34 mmol, 0,06 Äquiv.) Fluoresceinisothiocyanat (FITC) als Feststoff zugesetzt und die Mischung für 12 h bei 80 °C gerührt. Der Kolbeninhalt wird in 400 mL EE gefällt, filtriert und anschließend drei Mal mit 200 mL 2-Propanol gewaschen. Die Trocknung erfolgt bei Raumtemperatur im Vakuum bis zur Massekonstanz.

Ausbeute: 0,98 g (**F 3**, 5,56 mmol, 97 %, m%_{FITC} = 1,50).

¹H-NMR (250 MHz, D₂O) δ: 4,34 (1H, H2), 4,49 (1H, H3), 4,99 (1H, H4), 5,29 (1H, H5), 5,64 ppm (1H, H1).

¹³C-NMR (62,5 MHz, D₂O) δ: 68,9 (C2), 69,6 (C3), 71,9 (C5), 78,8 (C4), 99,8 (C1), 175,0 ppm (C=O).

4.3.7 Thiocarbamidierung von Polygalacturonsäure in 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (BMIMCl)

In einem 50 mL-Dreihalsrundkolben mit Stickstoffeinlass und Rückflusskühler wurden 18,0 g (0,103 mol) BMIMCl und 1,0 g (5,68 mmol) getrocknete Polygalacturonsäure unter Stickstoffatmosphäre gemischt. Die Temperatur wurde unter Rühren auf 80 °C erhöht, wobei Vakuum angelegt wurde. Nach Erhalt einer Suspension wurde die Temperatur für 10 min auf 140 °C erhöht und Polygalacturonsäure ging in Lösung. In die auf 40 °C abgekühlte Lösung werden 134,0 mg (0,34 mmol, 0,06 Äquiv.) Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gegeben und das Gemisch für 12 h bei 80 °C gerührt. Der Inhalt des Kolbens wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 30 mL entionisiertem Wasser versetzt. Die entstandene Lösung wurde in Aceton gefällt und der erhaltene Feststoff filtriert, drei Mal mit 200 mL Methanol und zwei Mal mit 100 mL Aceton gewaschen. Die Trocknung erfolgt bei Raumtemperatur im Vakuum bis zur Massekonstanz.

Ausbeute: 0,95 g (**F 6**, 5,39 mmol, 95 %, $m\%_{\text{FITC}} = 9,18$).

¹H-NMR (250 MHz, D₂O) δ : 1,26 (3H, R-CH₃), 1,65 (2H, R-CH₂-CH₃), 2,17 (2H, R-CH₂-CH₂-CH₃), 4,10 (1H, H₂ AGE), 4,23 (3H, N-CH₃), 4,34 (1H, H₃ AGE), 4,55 (2H, N-CH₂-R), 5,22 (1H, H₅ AGE), 5,44 (1H, H₁ AGE), 7,77 (1H, Ar-H), 7,80 (1H, Ar-H), 9,01 ppm (1H, Ar-H).

¹³C-NMR (62,5 MHz, D₂O) δ : 12,7 (R-CH₃), 18,7 (R-CH₂-CH₃), 31,3 (R-CH₂-CH₂-CH₃), 35,7 (N-CH₃), 49,3 (N-CH₂-R), 68,1 (C₂), 68,5 (C₃), 70,9 (C₅), 78,3 (C₄), 99,5 (C₁), 122,4, 123,7 (N-CH₂-CH₂-N), 135,8 (N-CH₂-N), 173,4 (C=O) ppm.

4.3.8 Umsetzung von Polygalacturonsäure mit Berberinchlorid

1,51 g (8,57 mmol) Polygalacturonsäure werden in 50 mL Wasser suspendiert und 57,3 mg (0,15 mmol) Berberinchlorid hinzugegeben und für 0,5 h gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert mit verdünntem Ammoniak auf pH 7 eingestellt, wobei die Viskosität zunahm und eine Lösung entstand. Die Lösung wird in 200 mL Isopropanol gefällt und drei Mal mit MeOH gewaschen. Anschließend wurde erneut in 30 mL Wasser gelöst und mit 150 mL Isopropanol

4 Experimenteller Teil

gefällt, filtriert, drei Mal mit 200 mL 2-Propanol gewaschen. Die Trocknung erfolgt bei Raumtemperatur im Vakuum bis zur Massekonstanz.

Zur Bestimmung der Berberinkonzentration wurde eine UV-Vis-Kalibration durchgeführt. Hierfür wurde eine Konzentrationsreihe von Berberinchlorid in Wasser UV-Vis-spektroskopisch untersucht. Die Absorption ist gegen die Konzentration der Probe beim Absorptionsmaximum von 357 nm aufgetragen (Abbildung 81).

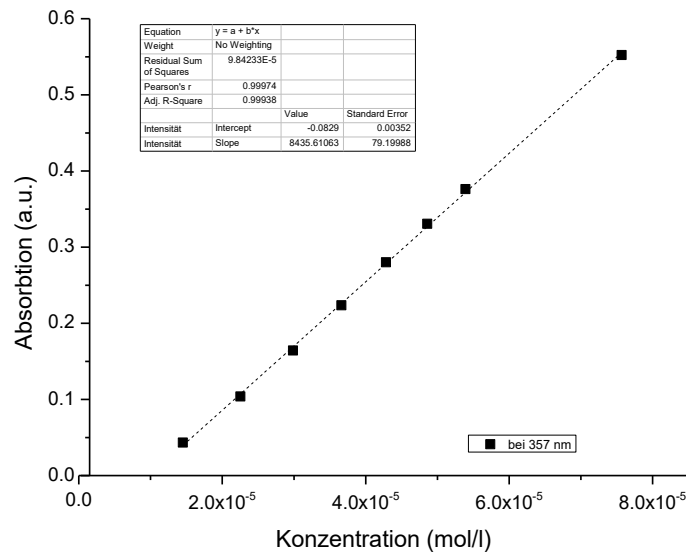


Abbildung 81: Kalibriergerade für die Bestimmung des Berberingehaltes von Pektinproben. Absorption bei $\lambda_{\text{max}} = 357 \text{ nm}$ aufgetragen gegen die Konzentration von Berberinchlorid in Wasser.

Nach dem Beer'schen Gesetz ist die Lichtabsorption einer farbigen Lösung proportional zur Konzentration einer Substanz, die in einem farblosen Lösemittel gelöst ist. Nach dem Lambert'schen Gesetz ist die Lichtabsorption einer Lösung bei konstanter Konzentration der gelösten Substanz der Länge des Weges proportional, den das Licht durch die Probe zurücklegt. Daraus folgt:

$$A = \varepsilon c d = \lg \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

A - Absorbanz

I_0 - Intensität des eingestrahnten Lichtes

I - Intensität des abgeschwächten Lichtes

ε - molarer (dekadischer) Absorptionskoeffizient

c - Konzentration der Probe

d - Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe

4 Experimenteller Teil

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte ein Berberingehalt von 2,2m% im Polysaccharid ermittelt werden.

4.3.9 Silylierung von Polygalacturonsäure mit Trimethylsilylchlorid (TMSCl)

In einem 250 mL-Dreihalsrundkolben mit Stickstoffeinlass und Rückflusskühler werden 3,0 g (17,03 mmol) getrocknete Polygalacturonsäure in 100 mL Formamid suspendiert und unter Rühren bei 95 °C erhitzt, wobei Polygalacturonsäure in Lösung geht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 9,26 g (0,136 mol, 8,0 Äquivalente) Imidazol zugegeben, gefolgt von 11,08 g (12,95 mL, 0,068 mol, 6,0 Äquivalente) TMSCl. Das Gemisch wird für 12 h bei 50 °C gerührt, dabei beginnt nach kurzer Zeit das Produkt auszufallen. Der Kolbeninhalt wurde in 1 L 2-Propanol gefällt, filtriert und drei Mal mit 200 mL Methanol gewaschen. Das erhaltende Trimethylsilylpolygalacturonat wurde im Vakuum bei 50 °C bis zur Massekonstanz getrocknet.

Ausbeute: 3,40 g (**Si 4**, 15,90 mmol, 98 %, DS = 0,6).

IR (KBr, cm^{-1}): 1734 (m; (C=O)), 1604 (s; (COO-)), 1254 (m; ($\text{R}_3\text{-Si-O-}$)), 844 (m, ($\text{R}_3\text{-Si-O}$)).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O) δ : 0,27, 0,40 (9H, Si- CH_3), 4,03–5,35 (5H, AGE). Signale bei 7,71 ppm und 8,69 ppm entsprechen dem Imidazolium-Gegenion.

$^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, D_2O) δ : 0,2, 0,3 (Si- CH_3), 65-105 (AGE, 170,8 (C6). Die Signale bei 122,2 und 135,9 ppm entsprechen dem Imidazolium-Gegenion.

Si-Gehalt (berechnet; gefunden) (Gew.-%): 5,73 %; 5,32 %.

4.3.10 Silylierung von Polygalacturonsäure mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS)

In einem 250 mL-Dreihalsrundkolben mit Stickstoffeinlass und Rückflusskühler werden 3,0 g (17,0 mmol) getrocknete Polygalacturonsäure in 100 mL Formamid suspendiert und unter Rühren bei 95 °C erhitzt, wobei Polygalacturonsäure in Lösung geht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 16,46 g (21,4 mL, 0,102 mol, 6,0 Äquivalente) HMDS und eine katalytische Menge TMSCl (0,1 mL) zugegeben. Das Gemisch wird 2 h bei 50 °C gerührt, im

4 Experimenteller Teil

Anschluss in 1 L 2-Propanol gefällt, filtriert und drei Mal mit 200 mL Methanol gewaschen. Das erhaltene Trimethylsilylpolygalacturonat wurde im Vakuum bei 50 °C bis zur Massekonstanz getrocknet.

Ausbeute: 4,3 g (**Si 7**, 16,74 mmol, 96 %, DS = 0,9).

IR (KBr, cm^{-1}): 3300 (s; (OH)), 1724 (m; (C = O) Amid I), 1688 (m, (NH) Amid II), 1604 ((m, COO-)), 1254 (m, (R₃-Si-O-)), 844 (m, (R₃-Si-O-)).

¹H-NMR (250 MHz, D₂O) δ : 0,33 (9H, Si-CH₃), 4,07 (1H, AGE, H2), 4,31 (1H, AGE, H3), 5,13 (1H, AGE, H5), 5,42 (1H, AGE, H1), 8.16 ppm (1H, C(O)NH₂).

¹³C-NMR (62,5 MHz, D₂O) δ : 0,4, 1,5 (Si-CH₃), 68,3 (C2), 69,3 (C3), 71,5 (C5), 78,5 (C4), 99,6 (C1), 157,5 (COO-NH₄⁺), 174,8 ppm (C6, CONH₂).

Si-Gehalt (berechnet; gefunden) (Gew.-%): 9,86 %; 9,69 %.

4.3.11 Silylierung von Polygalacturonsäure mit *tert*-Hexyldimethylchlorsilan (TDSCI)

In einem 250 mL-Dreihalsrundkolben mit Stickstoffeinlass und Rückflusskühler werden 3,0 g (17,03 mmol) getrocknete Polygalacturonsäure in 100 mL Formamid suspendiert und unter Rühren bei 95 °C erhitzt, wobei Polygalacturonsäure in Lösung geht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 10,43 g (0,153 mol, 9,0 Äquivalente) Imidazol und 18,3 g (0,102 mol, 6,0 Äquivalente) TDSCI zugegeben. Das Gemisch wird für 12 h bei 50 °C gerührt, dabei beginnt das Produkt bereits auszufallen. Das Reaktionsgemisch wird in 1 L Methanol gefällt, filtriert und drei Mal mit 200 mL Methanol gewaschen. Das erhaltende *tert*-Hexyldimethylsilylpolygalacturonat wird im Vakuum bei 50 °C bis zur Massekonstanz getrocknet.

Ausbeute: 5,85 g (**Si 16**, 14,60 mmol, 86 %, DS = 1,2).

IR (KBr, cm^{-1}): 1734 (m, (C=O)), 1604 (s; (COO-)), 1254 (m, (R₃-Si-O-)), 844 (m, (R₃-Si-O-)).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ : 0,01 (6H, Si-CH₃), 0,76-0,86 (12H, -CH₃), 1,57 (1H, -CH-(CH₃)₂), 3,69 (1H, H2), 3,95 (1H, H3), 4,36 (1H, H5), 5,01 (1H, H1). Signale bei 7,07 ppm und 7,76 ppm sind dem Imidazolium-Gegenion zuzuordnen.

4 Experimenteller Teil

¹³C-NMR (62,5 MHz, DMSO_{d6}) δ : -0,61, -2,1 (Si-CH₃), 18,9, 20,7 (R-CH₃), 34,2 (CH-R₃), 39,5 (Si-C-R₃), 65-105 (AGU), 170,7 (C6). Die Signale bei 121,7 und 135,4 ppm entsprechen Imidazolium-Gegenion.

Si-Gehalt (berechnet; gefunden) (Gew.-%): 7,93 %; 7,88 %.

4.3.12 Silylierung von Polygalacturonsäure mit *tert*-Butyldimethylchlorsilan (tBDMCl)

In einem 250 mL-Dreihalsrundkolben mit Stickstoffeinlass und Rückflusskühler werden 3,0 g (17,03 mmol) getrocknete Polygalacturonsäure in 100 mL Formamid suspendiert und unter Rühren bei 95 °C erhitzt, wobei Polygalacturonsäure in Lösung geht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 13,91 g (0,204 mol, 12,0 Äquivalente) Imidazol und 20,53 g (0,136 mol, 8,0 Äquivalente) tBDMCl zugegeben. Das Gemisch wird für 12 h bei 50 °C gerührt und im Anschluss in 1 L Methanol gefällt, filtriert und drei Mal mit 200 mL Methanol gewaschen. Das erhaltende *tert*-Butyldimethylsilylpolygalacturonat wird im Vakuum bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 5,40 g (**Si 21**, 14,49 mmol, 85 %, DS = 1,1).

IR (KBr, cm⁻¹): 1734 (m, (C=O)), 1604 (s, (COO-)), 1254 (m, (R₃-Si-O-)), 844 (m, (R₃-Si-O-)).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO_{d6}) δ : 0,04 (6H, Si-(CH₃)₂), 0,87 (9H, Si-C-(CH₃)₃), 3,5 – 5,5 (5H, AGE). Signale bei 7,01 ppm und 7,64 ppm sind dem Imidazolium-Gegenion zuzuordnen.

¹³C-NMR (62,5 MHz, DMSO_{d6}) δ : -2,22, -4,72 (Si-CH₃), 18,54 (Si-C-R₃), 26,32 (Si-C-CH₃), 65-105 (AGU), 170,9 (C6). Die Signale bei 122,0 und 135,5 ppm entsprechen Imidazolium-Gegenion.

Si-Gehalt (berechnet; gefunden) (Gew.-%): 8,25 %; 8,17 %.

4.3.13 Silylierung von Polygalacturonsäure mit Dimethylphenylchlorsilan (DMPSCI)

In einem 250 mL-Dreihalsrundkolben mit Stickstoffeinlass und Rückflusskühler werden 3,0 g (17,03 mmol) getrocknete Polygalacturonsäure in 100 mL Formamid suspendiert und unter

4 Experimenteller Teil

Rühren bei 95 °C erhitzt, wobei Polygalacturonsäure in Lösung geht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 13,91 g (0,204 mol, 12,0 Äquivalente) Imidazol und 23,22 g (0,136 mol, 8,0 Äquivalente) DMPSCI zugegeben. Das Gemisch wird für 12 h bei 50 °C gerührt, im Anschluss in 1 L 2-Propanol gefällt, filtriert und drei Mal mit 200 mL Methanol gewaschen. Das erhaltende Dimethylphenylsilylpolygalacturonat wird im Vakuum bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 7,40 g (**Si 26**, 16,10 mmol, 94 %, DS = 1,5).

IR (KBr, cm^{-1}): 1734 (m, (C=O)), 1604 (s, (COO-)), 1427 (m, (Si-Phenyl)) 1254 (m, (R₃-Si-O-)), 1115 (m, (Si-Phenyl)), 844 (m, (R₃-Si-O-)).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ : 0,27, 0,32 (6H, Si-(CH₃)₂), 3,5 – 5,5 (5H, AGE), 7,39, 7,55 (5H, Phenyl). Signale bei 7,08 ppm und 7,76 ppm sind dem Imidazolium-Gegenion zuzuordnen.

¹³C-NMR (62,5 MHz, DMSO-d₆) δ : 0,3 1,2 (Si-CH₃), 65-105 (AGU), 128,2 – 133,2 (Phenyl), 170,8 (C6). Die Signale bei 121,8 und 139,6 ppm entsprechen Imidazolium-Gegenion.

Si-Gehalt (berechnet; gefunden) (Gew.-%): 9,76 %; 9,73 %.

4.3.14 Silylierung von Polygalacturonsäure mit Dimethylvinylchlorsilan (DMVinCl)

In einem 250 mL-Dreihalsrundkolben mit Stickstoffeinlass und Rückflusskühler werden 3,0 g (17,03 mmol) getrocknete Polygalacturonsäure in 100 mL Formamid suspendiert und unter Rühren bei 95 °C erhitzt, wobei Polygalacturonsäure in Lösung geht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 13,91 g (0,204 mol, 12,0 Äquivalente) Imidazol und von 16,43 g (0,136 mol, 8,0 Äquivalente) DMPSCI zugegeben. Das Gemisch wird für 12 h bei 50 °C gerührt, im Anschluss in 1 L 2-Propanol gefällt, filtriert und drei Mal mit 200 mL Methanol gewaschen. Das erhaltende Dimethylvinylsilylpolygalacturonat wird im Vakuum bei 50 °C getrocknet.

Ausbeute: 6,71 g (**Si 31**, 15,72 mmol, 92 %, DS = 1,9).

4 Experimenteller Teil

IR (KBr, cm^{-1}): 3051, 2960 (m, (Si-Vinyl)), 1748 (m, (C=O)), 1596 (s, (COO-)), 1257 (m, ($\text{R}_3\text{-Si-O-}$)), 841 (m, ($\text{R}_3\text{-Si-O-}$)).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ : 0,09, 0,14 (6H, $\text{Si-(CH}_3)_2$), 3,5 – 5,5 (5H, AGE), 5,6 – 6,3 (3H, Vinyl). Signale bei 7,06 ppm und 7,74 ppm sind dem Imidazolium-Gegenion zuzuordnen.

$^{13}\text{C-NMR}$ (62,5 MHz, DMSO-d_6) δ : -1,3, 0,8 (Si-CH_3), 65-105 (AGU), 132,7, 139,7 (Si-Vinyl), 171,1 (C6). Die Signale bei 121,9 und 140,8 ppm entsprechen Imidazolium-Gegenion.

Si-Gehalt (berechnet; gefunden) (Gew.-%): 13,61 %; 14,10 %.

4.3.15 Lösen von Polygalacturonsäure in 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (BMIMCl)

In einem 50 mL-Dreihalsrundkolben mit Stickstoffeinlass und Rückflusskühler wurden 18,0 g (0,103 mol) BMIMCl und 1,0 g (5,678 mmol) getrocknetes PGaA unter Stickstoffatmosphäre gemischt. Das Gemisch wurde auf 80 °C erwärmt, wobei der Kolben parallel dazu evakuiert wurde. Die Temperatur wurde für 10 min auf 140 °C erhöht und es entstand eine Lösung des Polysaccharides. Durch Abkühlen auf Raumtemperatur erhöhte sich die Viskosität der Lösung.

Zur Regeneration des gelösten Biopolymers wurde die ionische Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen entionisiertem Wasser verdünnt. Die klare Lösung wurde unter Verwendung einer Celluloseacetatmembran (MWCO von 3500 g/mol) gegen entionisiertes Wasser dialysiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 1,36 g farbloser, watteartiger Feststoff (**S 5**).

IR (KBr, cm^{-1}): 3410 (m, (-OH)); 2958 (m, (-CH₃)); 2935 (m, (-CH₂)); 1740 (s, (-COOH)); 1610, 1574 (s, (-COO-)); 1460 (m, (-CH / -CH₃)).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O) δ : 1,28 (3H, R-CH₃), 1,67 (2H, R-CH₂-CH₃), 2,18 (2H, R-CH₂-R), 4,11 (1H, H-C2-AGE), 4,25 (3H, N-CH₃), 4,35 (1H, H-C3-AGE), 4,55 (2H, N-CH₂-R), 5,24 (1H, H-C5-AGE), 5,45 (1H, H-C1-AGE), 7,79 (1H, Ar-H), 7,82 (1H, Ar-H), 9,02 ppm (1H, Ar-H).

4 Experimenteller Teil

¹³C-NMR (62,5 MHz, D₂O) δ : 12,8 (R-CH₃), 18,9 (R-CH₂-CH₃), 31,4 (R-CH₂-R)_c, 35,9 (N-CH₃), 49,5 (N-CH₂-R), 68,4 (C₂), 68,8 (C₃), 70,9 (C₅), 78,4 (C₄), 99,7 (C₁), 122,5 (N-CH₂-CH₂-N), 123,8 (N-CH₂-CH₂-N), 136,0 (N-CH₂-N), 173,5 (C=O) ppm.

Elementaranalyse (berechnet; gefunden) (Gew.-%): C (53,49 %, 43,14 %), H (7,05 %, 5,93 %), N (8,91 %, 4,22 %).

5 Anhang

Literaturverzeichnis

- [1] J. Contreras-Esquivel, R. Hours, C. Aguilar, M. Reyes-Vega, J. Romero, *Archivos latinoamericanos de nutricion* **1997**, 47, 208–216.
- [2] M. Norsker, M. Jensen, J. Adler-Nissen, *Food hydrocolloids* **2000**, 14, 237–243.
- [3] D. Mohnen, *Current Opinion in Plant Biology* **2008**, 11, 266–277.
- [4] M. Vauquelin, *Ann. chim* **1790**, 5, 92–106.
- [5] H. Braconnot, in *Annales de Chimie et de Physique*, **1825**, pp. 173–178.
- [6] R. M. McCready, M. Gee, *J. Agric. Food Chem.* **1960**, 8, 510–513.
- [7] S. Drusch, *Food Hydrocolloids* **2007**, 21, 1223–1228.
- [8] V. J. Morris, A. Gromer, A. R. Kirby, R. J. M. Bongaerts, A. Patrick Gunning, *Food Hydrocolloids* **2011**, 25, 230–237.
- [9] G. B. Seymour, J. P. Knox, others, *Pectins and Their Manipulation.*, Blackwell Publishing, **2002**.
- [10] A. G. Voragen, G.-J. Coenen, R. P. Verhoef, H. A. Schols, *Structural Chemistry* **2009**, 20, 263–275.
- [11] B. M. Yapo, *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86, 373–385.
- [12] B. L. Ridley, M. A. O'Neill, D. Mohnen, *Phytochemistry* **2001**, 57, 929–967.
- [13] J.-P. Vincken, H. A. Schols, R. J. F. J. Oomen, G. Beldman, R. G. F. Visser, A. G. J. Voragen, in *Advances in Pectin and Pectinase Research*, Springer, Dordrecht, **2003**, pp. 47–59.
- [14] J. Leroux, V. Langendorff, G. Schick, V. Vaishnav, J. Mazoyer, *Food Hydrocolloids* **2003**, 17, 455–462.
- [15] A. N. Round, N. M. Rigby, A. J. MacDougall, V. J. Morris, *Carbohydrate Research* **2010**, 345, 487–497.
- [16] M. M. H. Huisman, A. Oosterveld, H. A. Schols, *Food Hydrocolloids* **2004**, 18, 665–668.
- [17] J. L. Da Silva, M. A. Rao, *Food polysaccharides and their applications* **2006**, 353.
- [18] A. G. J. Voragen, W. Pilnik, J. F. Thibault, M. A. V. Axelos, C. Renard, in *Food Polysaccharides and Their Applications*, **1995**, pp. 287–339.
- [19] J. De Vries, **1988**.

- [20] T. P. Kravtchenko, M. Penci, A. G. J. Voragen, W. Pilnik, *Carbohydrate Polymers* **1993**, 20, 195–205.
- [21] A. J. Mort, F. Qiu, N. O. Maness, *Carbohydrate Research* **1993**, 247, 21–35.
- [22] P. J. H. Daas, A. G. J. Voragen, H. A. Schols, *Carbohydrate Research* **2000**, 326, 120–129.
- [23] P. J. H. Daas, H. A. Schols, H. H. J. de Jongh, *Carbohydrate Research* **2000**, 329, 609–619.
- [24] I. Fraeye, T. Duvetter, E. Dounghla, A. Van Loey, M. Hendrickx, *Trends in Food Science & Technology* **2010**, 21, 219–228.
- [25] J. A. de Vries, F. M. Rombouts, A. G. J. Voragen, W. Pilnik, *Carbohydrate Polymers* **1983**, 3, 245–258.
- [26] J.-F. Thibault, M.-C. Ralet, *Advanced dietary fibre technology* **2008**, 369.
- [27] B. B. Koubala, G. Kansci, L. I. Mbome, M.-J. Crépeau, J.-F. Thibault, M.-C. Ralet, *Food Hydrocolloids* **2008**, 22, 1345–1351.
- [28] D. N. Sila, S. Van Buggenhout, T. Duvetter, I. Fraeye, A. De Roeck, A. Van Loey, M. Hendrickx, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2009**, 8, 86–104.
- [29] F. Voragen, G. Beldman, H. Schols, *Advanced dietary fibre technology* **2008**, 379.
- [30] P. J. Daas, P. W. Arisz, H. A. Schols, G. A. De Ruiter, A. G. Voragen, *Analytical biochemistry* **1998**, 257, 195–202.
- [31] H. A. Schols, A. G. J. Voragen, *Progress in biotechnology* **1996**, 14, 3–19.
- [32] A. Oosterveld, *Pectic Substances from Sugar Beet Pulp: Structural Features, Enzymatic Modification, and Gel Formation.*, Oosterveld, **1997**.
- [33] M.-C. Ralet, M.-J. Crépeau, E. Bonnin, *Phytochemistry* **2008**, 69, 1903–1909.
- [34] C. K. Siew, P. A. Williams, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 4164–4171.
- [35] K. H. Caffall, D. Mohnen, *Carbohydrate Research* **2009**, 344, 1879–1900.
- [36] C. M. G. C. Renard, M.-J. Crépeau, J.-F. Thibault, *Carbohydrate Research* **1995**, 275, 155–165.
- [37] B. M. Yap, *Polymer Reviews* **2011**, 51, 391–413.
- [38] P. Komalavilas, A. J. Mort, *Carbohydrate research* **1989**, 189, 261–272.
- [39] C. Rihouey, C. Morvan, I. Borissova, A. Jauneau, M. Demarty, M. Jarvis, *Carbohydrate Polymers* **1995**, 28, 159–166.
- [40] H. A. Schols, E. J. Bakx, D. Schipper, A. G. J. Voragen, *Carbohydrate Research* **1995**, 279, 265–279.

- [41] M. Kouwijzer, H. Schols, S. Pérez, in *Progress in Biotechnology* (Eds.: J. Visser, A.G.J. Voragen), Elsevier, **1996**, pp. 57–65.
- [42] J. N. Glushka, M. Terrell, W. S. York, M. A. O'Neill, A. Gucwa, A. G. Darvill, P. Albersheim, J. H. Prestegard, *Carbohydrate Research* **2003**, 338, 341–352.
- [43] W. G. T. Willats, J. P. Knox, J. D. Mikkelsen, *Trends in Food Science & Technology* **2006**, 17, 97–104.
- [44] S. Vidal, T. Doco, P. Williams, P. Pellerin, W. S. York, M. A. O'Neill, J. Glushka, A. G. Darvill, P. Albersheim, *Carbohydrate Research* **2000**, 326, 277–294.
- [45] M. Bar-Peled, B. R. Urbanowicz, M. A. O'Neill, *Front. Plant Sci.* **2012**, 3.
- [46] M. Kobayashi, T. Matoh, J. Azuma, *Plant Physiology* **1996**, 110, 1017–1020.
- [47] M. A. O'Neill, D. Warrenfeltz, K. Kates, P. Pellerin, T. Doco, A. G. Darvill, P. Albersheim, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 22923–22930.
- [48] T. Ishii, T. Matsunaga, P. Pellerin, M. A. O'Neill, A. Darvill, P. Albersheim, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 13098–13104.
- [49] T. Ishii, H. Ono, *Carbohydrate Research* **1999**, 321, 257–260.
- [50] P. Pellerin, M. A. O'Neill, *Analisis* **1998**, 26, 32–36.
- [51] H. V. Scheller, R. L. Doong, B. L. Ridley, D. Mohnen, *Planta* **1999**, 207, 512–517.
- [52] G. J. Coenen, E. J. Bakx, R. P. Verhoef, H. A. Schols, A. G. J. Voragen, *Carbohydrate Polymers* **2007**, 70, 224–235.
- [53] S. Morell, L. Baur, K. P. Link, *J. Biol. Chem.* **1934**, 105, 1–13.
- [54] K. Keegstra, K. W. Talmadge, W. D. Bauer, P. Albersheim, *Plant Physiology* **1973**, 51, 188–197.
- [55] J. A. De Vries, A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, W. Pilnik, *Carbohydrate Polymers* **1981**, 1, 117–127.
- [56] B. M. Yapo, P. Lerouge, J.-F. Thibault, M.-C. Ralet, *Carbohydrate Polymers* **2007**, 69, 426–435.
- [57] I. Braccini, R. P. Grasso, S. Pérez, *Carbohydrate Research* **1999**, 317, 119–130.
- [58] S. Pérez, K. Mazeau, C. H. du Penhoat, *Plant Physiology and Biochemistry* **2000**, 38, 37–55.
- [59] C. Gouvion, K. Mazeau, I. Tvaroska, *Journal of Molecular Structure* **1995**, 344, 157–170.
- [60] M. Hricovíni, S. Bystrický, A. Malovíková, *Carbohydrate Research* **1991**, 220, 23–31.

- [61] M. Hricovini, R. N. Shah, J. P. Carver, *Biochemistry* **1992**, *31*, 10018–10023.
- [62] S. Cros, C. H. du Penhoat, N. Bouchemal, H. Ohassan, A. Imberty, S. Pérez, *International Journal of Biological Macromolecules* **1992**, *14*, 313–320.
- [63] A. D. Nola, G. Fabrizi, D. Lamba, A. L. Segre, *Biopolymers* **1994**, *34*, 457–462.
- [64] C. Gouvion, K. Mazeau, A. Heyraud, F. R. Taravel, I. Tvaroska, *Carbohydrate Research* **1994**, *261*, 187–202.
- [65] N. Bouchemal-Chibani, I. Braccini, C. Derouet, C. Hervédu Penhoat, V. Michon, *International Journal of Biological Macromolecules* **1995**, *17*, 177–182.
- [66] J. Ruggiero, R. Urbani, A. Cesàro, *International Journal of Biological Macromolecules* **1995**, *17*, 213–218.
- [67] E. R. Morris, D. A. Powell, M. J. Gidley, D. A. Rees, *Journal of Molecular Biology* **1982**, *155*, 507–516.
- [68] P. M. Gilsenan, R. K. Richardson, E. R. Morris, *Carbohydrate Polymers* **2000**, *41*, 339–349.
- [69] B. Boutherin, K. Mazeau, I. Tvaroska, *Carbohydrate Polymers* **1997**, *32*, 255–266.
- [70] M. A. V. Axelos, J.-F. Thibault, *International Journal of Biological Macromolecules* **1991**, *13*, 77–82.
- [71] T. C. Chou, N. Pintauro, J. L. Kokini, *Journal of Food Science* **1991**, *56*, 1365–1368.
- [72] D. Hourdet, G. Muller, *Carbohydrate Polymers* **1991**, *16*, 113–135.
- [73] M. A. V. Axelos, M. Branger, *Food Hydrocolloids* **1993**, *7*, 91–102.
- [74] L. Catoire, R. Goldberg, M. Pierron, C. Morvan, C. Hervé du Penhoat, *Eur Biophys J* **1998**, *27*, 127–136.
- [75] D. Hourdet, G. Muller, *Carbohydrate Polymers* **1987**, *7*, 301–312.
- [76] S. Cros, C. Garnier, M. A. V. Axelos, A. Imberty, S. Pérez, *Biopolymers* **1996**, *39*, 339–351.
- [77] G. A. Morris, T. J. Foster, S. E. Harding, *Food Hydrocolloids* **2000**, *14*, 227–235.
- [78] L. Catoire, C. Derouet, A.-M. Redon, R. Goldberg, C. Hervédu Penhoat, *Carbohydrate Research* **1997**, *300*, 19–29.
- [79] M. A. V. Axelos, J. F. Thibault, *The chemistry and technology of pectin* **1991**, *6*, 109–108.
- [80] J. P. Van Buren, *The chemistry and technology of pectin* **1991**, 1–22.

- [81] B. R. Thakur, R. K. Singh, A. K. Handa, D. M. A. Rao, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1997**, 37, 47–73.
- [82] C. Remoroza, S. Broxterman, H. Gruppen, H. A. Schols, *Carbohydrate Polymers* **2014**, 108, 338–347.
- [83] R. H. Walter, *The Chemistry and Technology of Pectin*, Academic Press, **2012**.
- [84] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, D. Thom, *FEBS Letters* **1973**, 32, 195–198.
- [85] I. Braccini, S. Pérez, *Biomacromolecules* **2001**, 2, 1089–1096.
- [86] M. D. Walkinshaw, S. Arnott, *Journal of Molecular Biology* **1981**, 153, 1075–1085.
- [87] N. M. Rigby, A. J. MacDougall, S. G. Ring, P. Cairns, V. J. Morris, P. A. Gunning, *Carbohydrate Research* **2000**, 328, 235–239.
- [88] D. A. Powell, E. R. Morris, M. J. Gidley, D. A. Rees, *Journal of Molecular Biology* **1982**, 155, 517–531.
- [89] M. C. Jarvis, D. C. Apperley, *Carbohydrate Research* **1995**, 275, 131–145.
- [90] R. Goldberg, C. Morvan, A. Jauneau, M. C. Jarvis, in *Progress in Biotechnology* (Eds.: J. Visser, A.G.J. Voragen), Elsevier, **1996**, pp. 151–172.
- [91] M. A. Ha, D. C. Apperley, M. C. Jarvis, *Plant Physiology* **1997**, 115, 593–598.
- [92] H. Tang, P. S. Belton, A. Ng, P. Ryden, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 510–517.
- [93] C. Gillet, M. Voué, P. Cambier, *J Exp Bot* **1998**, 49, 797–805.
- [94] J. Dainty, A. B. Hope, *Aust. Jnl. Of Bio. Sci.* **1961**, 14, 541–551.
- [95] D. S. Bush, J. G. McColl, *Plant Physiology* **1987**, 85, 247–260.
- [96] V. M. Dronnet, C. Renard, M. A. V. Axelos, J.-F. Thibault, *Carbohydrate polymers* **1996**, 30, 253–263.
- [97] A. Malovíková, M. Rinaudo, M. Milas, *Biopolymers* **1994**, 34, 1059–1064.
- [98] V. M. Dronnet, C. M. G. C. Renard, M. A. V. Axelos, J.-F. Thibault, in *Progress in Biotechnology* (Eds.: J. Visser, A.G.J. Voragen), Elsevier, **1996**, pp. 535–540.
- [99] S. Ghagare, G. B. Savitsky, H. G. Spencer, *Polymer* **1992**, 33, 4725–4727.
- [100] H. Abramovič, C. Klofutar, *European Polymer Journal* **1997**, 33, 1295–1300.
- [101] M. Voué, C. Gillet, *Biophysical Chemistry* **1994**, 51, 9–19.
- [102] G. S. Manning, *Quarterly Reviews of Biophysics* **1978**, 11, 179–246.

- [103] W. F. Moss, S. G. Lagu, D. W. Bearden, G. B. Savitsky, H. G. Spencer, *Polymer* **1994**, *35*, 3268–3271.
- [104] C. W. Tibbits, A. J. MacDougall, S. G. Ring, *Carbohydrate Research* **1998**, *310*, 101–107.
- [105] C. Renard, M. C. Jarvis, *Carbohydrate polymers* **1999**, *39*, 209–216.
- [106] A. Oosterveld, G. Beldman, M. J. F. Searle-van Leeuwen, A. G. J. Voragen, *Carbohydrate Polymers* **2000**, *43*, 249–256.
- [107] L. Alagna, T. Prosperi, A. A. G. Tomlinson, R. Rizzo, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 6853–6857.
- [108] N. Wellner, M. Kačuráková, A. Malovíková, R. H. Wilson, P. S. Belton, *Carbohydrate Research* **1998**, *308*, 123–131.
- [109] M. R. Guilherme, A. V. Reis, A. T. Paulino, T. A. Moia, L. H. C. Mattoso, E. B. Tambourgi, *Journal of Applied Polymer Science* **2010**, *117*, 3146–3154.
- [110] P. Harel, G. de La Quérière, L. Mignot, G.-A. Junter, *Industrial Crops and Products* **2000**, *11*, 259–264.
- [111] X. Li, S. Al-Assaf, Y. Fang, G. O. Phillips, *Carbohydrate Polymers* **2013**, *92*, 1133–1142.
- [112] I. Fraeye, E. Doungra, T. Duvetter, P. Moldenaers, A. Van Loey, M. Hendrickx, *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 2069–2077.
- [113] A. Ström, P. Ribelles, L. Lundin, I. Norton, E. R. Morris, M. A. K. Williams, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2668–2674.
- [114] L. Donato, C. Garnier, B. Novales, J.-L. Dublier, *Food Hydrocolloids* **2005**, *19*, 549–556.
- [115] C. Löfgren, S. Guillotin, A.-M. Hermansson, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 114–121.
- [116] C. Löfgren, S. Guillotin, H. Evenbratt, H. Schols, A.-M. Hermansson, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 646–652.
- [117] C. Löfgren, P. Walkenström, A.-M. Hermansson, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1144–1153.
- [118] J. A. Lopes da Silva, M. P. Gonçalves, *Carbohydrate Polymers* **1994**, *24*, 235–245.
- [119] J. Hwang, J. L. Kokini, *Carbohydrate Polymers* **1992**, *19*, 41–50.
- [120] D. Oakenfull, A. Scott, *Journal of Food Science* **1984**, *49*, 1093–1098.
- [121] C. Garnier, M. A. V. Axelos, J.-F. Thibault, *Carbohydrate Research* **1993**, *240*, 219–232.

- [122] M. A. V. Axelos, C. Garnier, C. M. G. C. Renard, J.-F. Thibault, in *Progress in Biotechnology* (Eds.: J. Visser, A.G.J. Voragen), Elsevier, **1996**, pp. 35–45.
- [123] W. Burchard, S. B. Ross-Murphy, *Physical Networks: Polymers and Gels*, Springer Science & Business Media, **1990**.
- [124] J. Chen, W. Liu, C.-M. Liu, T. Li, R.-H. Liang, S.-J. Luo, *Critical reviews in food science and nutrition* **2015**, *55*, 1684–1698.
- [125] S. M. Krall, R. F. McFeeters, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1311–1315.
- [126] P. Albersheim, H. Neukom, H. Deuel, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1960**, *90*, 46–51.
- [127] H. Deuel, G. Huber, R. Leuenberger, *HCA* **1950**, *33*, 1226–1228.
- [128] J. A. Klavons, R. D. Bennett, *Journal of Food Science* **1995**, *60*, 513–515.
- [129] E. F. Jansen, R. Jang, *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 1475–1477.
- [130] M.-C. Ralet, E. Bonnin, J.-F. Thibault, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, *753*, 157–166.
- [131] P. Matricardi, M. Dentini, V. Crescenzi, S. B. Ross-Murphy, *Carbohydrate Polymers* **1995**, *27*, 215–220.
- [132] C. Rosenbohm, I. Lundt, T. I. Christensen, N. G. Young, *Carbohydrate Research* **2003**, *338*, 637–649.
- [133] S. El-Nawawi, Y. Heikal, *Carbohydrate Polymers* **1995**, *27*, 191–195.
- [134] C. M. Renard, J.-F. Thibault, *Carbohydrate Research* **1996**, *286*, 139–150.
- [135] Y. Kim, Y. Yoo, K. Kim, J. Park, S. Yoo, *Journal of food science* **2008**, *73*, C367–C372.
- [136] I. Fraeye, A. De Roeck, T. Duvetter, I. Verlent, M. Hendrickx, A. Van Loey, *Food Chemistry* **2007**, *105*, 555–563.
- [137] J. L. Hunter, L. Wicker, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2005**, *85*, 2243–2248.
- [138] H. A. Schols, C. C. Geraeds, M. F. Searle-van Leeuwen, F. J. Kormelink, A. G. Voragen, *Carbohydrate Research* **1990**, *206*, 105–115.
- [139] P. J. H. Daas, K. Meyer-Hansen, H. A. Schols, G. A. De Ruiter, A. G. J. Voragen, *Carbohydrate Research* **1999**, *318*, 135–145.
- [140] T. Duvetter, D. N. Sila, S. Van Buggenhout, R. Jolie, A. Van Loey, M. Hendrickx, *Comprehensive reviews in food science and food safety* **2009**, *8*, 75–85.
- [141] M. Miralles-Houzelle, P. Hubert, E. Dellacherie, *Langmuir* **2001**, *17*, 1384–1391.

- [142] R. Liang, L. Wang, J. Chen, W. Liu, C. Liu, *Food hydrocolloids* **2015**, 50, 65–73.
- [143] I. C. M. Dea, J. K. Madden, *Food Hydrocolloids* **1986**, 1, 71–88.
- [144] M. S. Bush, M. C. McCann, *Physiologia Plantarum* **1999**, 107, 201–213.
- [145] M. T. Iglesias, J. E. Lozano, *Journal of Food Engineering* **2004**, 62, 215–223.
- [146] G. Schneider, M. Ziervogel, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1936**, 69, 2530–2536.
- [147] J. F. Carson, W. D. Maclay, *Journal of the American Chemical Society* **1946**, 68, 1015–1017.
- [148] H. Staudinger, G. Daumiller, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1937**, 529, 219–265.
- [149] H. Staudinger, E. Husemann, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1937**, 527, 195–236.
- [150] J. Solms, H. Deuel, *Helvetica Chimica Acta* **1951**, 34, 2242–2249.
- [151] H. Meyer, in *Analyse Und Konstitutionsermittlung Organischer Verbindungen*, Springer, **1938**, pp. 619–708.
- [152] R. Kohn, O. Markovič, E. Machová, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1983**, 48, 790–797.
- [153] J. F. Thibault, M. Rinaudo, *Biopolymers* **1985**, 24, 2131–2143.
- [154] E. L. Pippen, R. M. McCready, H. S. Owens, *Journal of the American Chemical Society* **1950**, 72, 813–816.
- [155] R. G. Schweiger, *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2973–2975.
- [156] Ľ. Rexová-Benková, M. Mračková, O. Luknár, R. Kohn, *Collect. Czech. Chem. Commun., CCCC* **1977**, 42, 3204–3213.
- [157] K. Heinrichová, R. Kohn, *Collect. Czech. Chem. Commun., CCCC* **1980**, 45, 427–434.
- [158] R. Kohn, I. Furda, A. Haug, O. Smidsrød, *Acta Chem Scand* **1968**, 22, 3098–102.
- [159] R. Kohn, A. Malovíková, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1978**, 43, 1709–1719.
- [160] J. N. BeMiller, *Chemistry and function of pectins* **1986**, 310, 2–12.
- [161] C. Renard, M. C. Jarvis, *Carbohydrate Polymers* **1999**, 39, 201–207.
- [162] L. Monfregola, M. Leone, V. Vittoria, P. Amodio, S. De Luca, *Polymer Chemistry* **2011**, 2, 800–804.
- [163] U. Einhorn-Stoll, T. Salazar, B. Jaafar, H. Kunzek, *Food / Nahrung* **n.d.**, 45, 332–337.

- [164] H. J. Rha, I. Y. Bae, S. Lee, S.-H. Yoo, P.-S. Chang, H. G. Lee, *Food Hydrocolloids* **2011**, 25, 545–548.
- [165] A. Sinitsya, J. Čopíková, V. Prutyanov, S. Skoblya, V. Machovič, *Carbohydrate Polymers* **2000**, 42, 359–368.
- [166] H. N. Cheng, Q.-M. Gu, R. G. Nickol, **2000**.
- [167] C. T. Musabayane, O. Munjeri, P. Bwititi, E. E. Osim, *J Endocrinol* **2000**, 164, 1–6.
- [168] O. Munjeri, J. H. Collett, J. T. Fell, *Journal of Controlled Release* **1997**, 46, 273–278.
- [169] O. Munjeri, J. Collett, J. Fell, *Drug Delivery* **1997**, 4, 207–211.
- [170] A. Synytsya, J. Čopíková, M. Marounek, P. Mlčochová, L. Sihelníková, S. Skoblya, H. Havlátová, P. Matějka, M. Maryška, V. Machovič, *Carbohydrate polymers* **2004**, 56, 169–179.
- [171] Y. Zouambia, N. Moulai-Mostefa, M. Krea, *Carbohydrate Polymers* **2009**, 78, 841–846.
- [172] O. Kurita, Y. Miyake, E. Yamazaki, *Carbohydrate Polymers* **2012**, 87, 1720–1727.
- [173] S. Geresh, R. P. Dawadi, S. (M.) Arad, *Carbohydrate Polymers* **2000**, 43, 75–80.
- [174] L. Fan, M. Cao, S. Gao, W. Wang, K. Peng, C. Tan, F. Wen, S. Tao, W. Xie, *Carbohydrate polymers* **2012**, 88, 707–712.
- [175] T. Katav, L. Liu, T. Traitel, R. Goldbart, M. Wolfson, J. Kost, *Journal of Controlled Release* **2008**, 130, 183–191.
- [176] I. Šimkovic, A. Synytsya, I. Uhliaríková, J. Čopíková, *Carbohydrate polymers* **2009**, 76, 602–606.
- [177] I. Šimkovic, I. Uhliaríková, M. P. Yadav, R. Mendichi, *Carbohydrate Polymers* **2010**, 82, 815–821.
- [178] J. D. Smart, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, 57, 1556–1568.
- [179] A. Bernkop-Schnürch, *Advanced drug delivery reviews* **2005**, 57, 1569–1582.
- [180] I. Šimkovic, R. Mendichi, I. Uhliaríková, *Carbohydrate Polymers* **2008**, 74, 611–616.
- [181] R. Sharma, M. Ahuja, *Carbohydrate Polymers* **2011**, 85, 658–663.
- [182] R. Sharma, M. Ahuja, H. Kaur, *Carbohydrate Polymers* **2012**, 87, 1606–1610.
- [183] S. Majzoob, F. Atyabi, F. Dorkoosh, K. Kafedjiiski, B. Loretz, A. Bernkop-Schnürch, *Journal of pharmacy and pharmacology* **2006**, 58, 1601–1610.
- [184] G. Perera, J. Hombach, A. Bernkop-Schnürch, *Aaps Pharmscitech* **2010**, 11, 174–180.

- [185] G. Perera, J. Barthelmes, A. Bernkop-Schnürch, *Journal of Controlled Release* **2010**, *145*, 240–246.
- [186] J. Martinichen-Herrero, E. Carbonero, G. Sassaki, P. Gorin, M. Iacomini, *International journal of biological macromolecules* **2005**, *35*, 97–102.
- [187] J. Wang, Q. Zhang, Z. Zhang, Z. Li, *International Journal of Biological Macromolecules* **2008**, *42*, 127–132.
- [188] N. C. Maas, A. H. P. Gracher, G. L. Sassaki, P. A. J. Gorin, M. Iacomini, T. R. Cipriani, *Carbohydrate Polymers* **2012**, *89*, 1081–1087.
- [189] L. Fan, S. Gao, L. Wang, P. Wu, M. Cao, H. Zheng, W. Xie, J. Zhou, *Journal of Applied Polymer Science* **2012**, *124*, 2171–2178.
- [190] F. V. Vityazev, V. V. Golovchenko, O. A. Patova, N. N. Drozd, V. A. Makarov, A. S. Shashkov, Y. S. Ovodov, *Biochemistry (Moscow)* **2010**, *75*, 759–768.
- [191] T. R. Cipriani, A. H. P. Gracher, L. M. de Souza, R. J. C. Fonseca, C. L. R. Belmiro, P. A. J. Gorin, G. L. Sassaki, M. Iacomini, *Thromb Haemost* **2009**, *101*, 860–866.
- [192] T. Takei, M. Sato, H. Ijima, K. Kawakami, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3525–3530.
- [193] M. I. Abdel-Hamid, K. S. Khairou, R. M. Hassan, *European Polymer Journal* **2003**, *39*, 381–387.
- [194] B. Gupta, M. Tummalapalli, B. L. Deopura, M. S. Alam, *Carbohydrate Polymers* **2013**, *98*, 1160–1165.
- [195] S. E. Bellú, J. C. González, S. I. García, S. R. Signorella, L. F. Sala, *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 1059–1067.
- [196] K. Petzold, A. Koschella, D. Klemm, B. Heublein, *Cellulose* **2003**, *10*, 251–269.
- [197] D. Klemm, M. Schnabelrauch, A. Stein, B. Philipp, W. Wagenknecht, I. Nehls, *PAPIER* **1990**, *44*, 624–632.
- [198] M. Gericke, P. Fardim, T. Heinze, M. Gericke, P. Fardim, T. Heinze, *Molecules* **2012**, *17*, 7458–7502.
- [199] S. Köhler, T. Heinze, *Macromolecular Bioscience* **2007**, *7*, 307–314.
- [200] M. Gericke, T. Liebert, O. A. E. Seoud, T. Heinze, *Macromolecular materials and engineering* **2011**, *296*, 483–493.
- [201] M. Kostag, S. Köhler, T. Liebert, T. Heinze, in *Macromolecular Symposia*, Wiley Online Library, **2010**, pp. 96–106.
- [202] V. F. Henglein, K. Scheinost, *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics* **1956**, *21*, 59–73.

- [203] R. E. Harmon, *Carbohydr Res* **1973**, 31, 407–409.
- [204] H. Mizuno, N. Iso, T. Saito, T. Suemoto, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)* **1984**.
- [205] M.-W. Lee, C.-L. Hung, J.-C. Cheng, Y.-J. Wang, *Biomaterials* **2005**, 26, 3793–3799.
- [206] J. F. A. S. Maior, A. V. Reis, E. C. Muniz, O. A. Cavalcanti, *International journal of pharmaceutics* **2008**, 355, 184–194.
- [207] M. F. Bostanudin, M. Arafat, M. Sarfraz, D. C. Górecki, E. Barbu, *Polymers* **2019**, 11, 789.
- [208] G. A. Morris, Z. Hromádková, A. Ebringerová, A. Malovíková, J. Alföldi, S. E. Harding, *Carbohydrate polymers* **2002**, 48, 351–359.
- [209] T. Matoh, M. Kobayashi, *Journal of Plant Research* **1998**, 111, 179–190.
- [210] A. Oosterveld, G. Beldman, A. G. Voragen, *Carbohydrate Research* **2000**, 328, 199–207.
- [211] J.-F. Thibault, *Carbohydrate research* **1986**, 155, 183–192.
- [212] R. Semdé, A. Moës, M. J. Devleeschouwer, K. Amighi, *Drug development and industrial pharmacy* **2003**, 29, 203–213.
- [213] T. Yoshimura, K. Sengoku, R. Fujioka, *Polymer bulletin* **2005**, 55, 123–129.
- [214] F. T. Li, H. Yang, Y. Zhao, R. Xu, *Chinese Chemical Letters* **2007**, 18, 325–328.
- [215] J. F. A. Souto-Maior, A. V. Reis, L. N. Pedreiro, O. A. Cavalcanti, *Polymer International* **2010**, 59, 127–135.
- [216] R. K. Mishra, M. Datt, K. Pal, A. K. Banthia, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2008**, 19, 2275–2280.
- [217] S. Farris, K. M. Schaich, L. Liu, P. H. Cooke, L. Piergiovanni, K. L. Yam, *Food hydrocolloids* **2011**, 25, 61–70.
- [218] B. Gupta, M. Tummalapalli, B. Deopura, M. Alam, *Carbohydrate polymers* **2014**, 106, 312–318.
- [219] S. Cui, B. Yao, M. Gao, X. Sun, D. Gou, J. Hu, Y. Zhou, Y. Liu, *Carbohydrate polymers* **2017**, 157, 766–774.
- [220] G. A. De Ruiter, H. A. Schols, A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, *Analytical Biochemistry* **1992**, 207, 176–185.
- [221] H. N. Englyst, J. H. Cummings, *Analyst* **1984**, 109, 937–942.
- [222] M. E. Quigley, H. N. Englyst, *Analyst* **1994**, 119, 1511–1518.

- [223] S.-I. Hakomori, *J Biochem (Tokyo)* **1964**, 55, 205–208.
- [224] A. G. J. Voragen, H. A. Schols, W. Pilnik, *Food Hydrocolloids* **1986**, 1, 65–70.
- [225] A. M. Bochek, N. M. Zabivalova, G. A. Petropavlovskii, *Russian Journal of Applied Chemistry* **2001**, 74, 796–799.
- [226] C. H. Hills, C. L. Ogg, R. Speiser, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1945**, 17, 507–510.
- [227] A. Plöger, *Journal of Food Science* **1992**, 57, 1185–1186.
- [228] I. L. Novosel'skaya, N. L. Voropaeva, L. N. Semenova, S. S. Rashidova, *Chem Nat Compd* **2000**, 36, 1–10.
- [229] M. H. Carré, D. Haynes, *Biochem J* **1922**, 16, 60–69.
- [230] E. K. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.* **1926**, 48, 2945–2946.
- [231] M. Lüdtke, H. Felser, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1941**, 549, 1–43.
- [232] von F. A. Henglein, B. Vollmert, *Makromol. Chem.* **1948**, 2, 77–87.
- [233] B. Vollmert, in *ANGEWANDTE CHEMIE*, VCH PUBLISHERS INC 303 NW 12TH AVE, DEERFIELD BEACH, FL 33442-1788, **1947**, pp. 177–177.
- [234] F. A. Henglein, in *Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1955**, pp. 226–263.
- [235] F. A. Henglein, in *Aufbau· Speicherung· Mobilisierung Und Umbildung Der Kohlenhydrate/Formation· Storage· Mobilization and Transformation of Carbohydrates*, Springer, **1958**, pp. 405–478.
- [236] E. A. McComb, R. M. McCready, *Analytical Chemistry* **1957**, 29, 819–821.
- [237] A. Mizote, H. Odagiri, K. Tōei, K. Tanaka, *Analyst* **1975**, 100, 822–826.
- [238] H.-J. Zhong, M. A. K. Williams, D. M. Goodall, M. E. Hansen, *Carbohydrate Research* **1998**, 308, 1–8.
- [239] R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*, Elsevier, **2000**.
- [240] C. A. Monnig, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 280–314.
- [241] Y. C. Lee, *Journal of Chromatography A* **1996**, 720, 137–149.
- [242] A. J. Mort, E. M. W. Chen, *ELECTROPHORESIS* **1996**, 17, 379–383.
- [243] Z. Zhang, M. L. Pierce, A. J. Mort, *ELECTROPHORESIS* **1996**, 17, 372–378.
- [244] M. A. Kabel, H. A. Schols, A. G. J. Voragen, *Carbohydrate Polymers* **2001**, 44, 161–165.

- [245] G.-J. W. M. van Alebeek, O. Zabolina, G. Beldman, H. A. Schols, A. G. J. Voragen, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, 831–840.
- [246] B. Quémener, J. C. C. Pino, M.-C. Ralet, E. Bonnin, J.-F. Thibault, *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 38, 641–648.
- [247] M. L. Fishman, P. Cooke, A. Hotchkiss, W. Damert, *Carbohydrate research* **1993**, 248, 303–316.
- [248] A. R. Kirby, A. P. Gunning, V. J. Morris, *Biopolymers* **1996**, 38, 355–366.
- [249] A. Sinitsya, J. Copiková, H. Pavliková, *Journal of carbohydrate chemistry* **1998**, 17, 279–292.
- [250] M. Ousalem, J. P. Busnel, T. Nicolai, *International journal of biological macromolecules* **1993**, 15, 209–213.
- [251] G. C. Guimarães, M. C. Coelho Júnior, E. E. Garcia Rojas, *J. Chem. Eng. Data* **2009**, 54, 662–667.
- [252] M. L. Fishman, D. T. Gillespie, S. M. Sondney, Y. S. El-Atawy, *Carbohydrate Research* **1991**, 215, 91–104.
- [253] F. Kar, N. Arslan, *Carbohydrate Polymers* **1999**, 40, 277–284.
- [254] H. Grasdalen, B. J. Kvam, *Macromolecules* **1986**, 19, 1913–1920.
- [255] G. Ravanat, M. Rinaudo, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* **1980**, 19, 2209–2222.
- [256] K. Komae, A. Misaki, *Agricultural and Biological Chemistry* **1989**, 53, 1237–1245.
- [257] E. Bonnin, K. Clavurier, S. Daniel, S. Kauppinen, J. D. M. Mikkelsen, J.-F. Thibault, *Carbohydrate Polymers* **2008**, 74, 411–418.
- [258] H. Bredereck, R. Gompper, H. Rempfer, K. Klemm, H. Keck, *Chemische Berichte* **1959**, 92, 329–337.
- [259] M. P. Filippov, M. S. Komissarenko, R. Kohn, *Carbohydrate Polymers* **1988**, 8, 131–135.
- [260] Filippov M.p., *Food Hydrocolloids* **1992**, 6, 115–142.
- [261] M. Huang, Z. Ma, E. Khor, L.-Y. Lim, *Pharmaceutical research* **2002**, 19, 1488–1494.
- [262] M. Obst, T. Heinze, *Macromolecular Materials and Engineering* **2016**, 301, 65–70.
- [263] H. Thiele, G. Anderson, *Koll. Z* **1955**, 76, 140.
- [264] T. W. Green, P. G. M. Wuts, *New York* **1991**.

- [265] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme Stuttgart, **1994**.
- [266] L. Bhattacharyya, J. S. Rohrer, *Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products*, John Wiley & Sons, **2012**.
- [267] T. Eicher, S. Hauptmann, A. Speicher, *The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis, and Applications*, John Wiley & Sons, **2013**.
- [268] H. R. Kricheldorf, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1972**, 763, 17–38.
- [269] P. C. Kuzma, L. E. Brown, T. M. Harris, *The Journal of Organic Chemistry* **1984**, 49, 2015–2018.
- [270] M. J. Keijbets, W. Pilnik, *Carbohydrate Research* **1974**, 33, 359–362.
- [271] R. Nakao, K. Oka, T. Fukumoto, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1981**, 54, 1267–1268.
- [272] M. L. Fishman, H. K. Chau, F. Kolpak, J. Brady, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4494–4501.
- [273] O. A. El Seoud, A. Koschella, L. C. Fidale, S. Dorn, T. Heinze, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2629–2647.
- [274] M. E. Zakrzewska, E. Bogel-Łukasik, R. Bogel-Łukasik, *Energy Fuels* **2010**, 24, 737–745.
- [275] L. Dai, S. Yu, Y. Shan, M. He, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2004**, 2004, 237–241.
- [276] Y. Fukaya, A. Sugimoto, H. Ohno, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 3295–3297.
- [277] S. Köhler, T. Liebert, T. Heinze, *Macromolecular Bioscience* **2009**, 9, 836–841.
- [278] I. S. Fagerson, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1969**, 17, 747–750.
- [279] N. Igura, I. Hayakawa, Y. Fujio, *Starch-Stärke* **1997**, 49, 2–5.
- [280] S. Spange, A. Reuter, E. Vilsmeier, T. Heinze, D. Keutel, W. Linert, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1998**, 36, 1945–1955.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Marktschätzung von Pektinanwendungen nach IMC International Hydrocolloids Review.	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der zielorientierten Hydrophobierung von Polygalacturonsäure unter Erhaltung der Wasserlöslichkeit und der metallioneninduzierten Gelbildungseigenschaft.	13
Abbildung 3: Die Struktur einer Homogalacturonan-Einheit, teilweise an C6 als Methylester und an Positon 2 und 3 acetyliert.	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verteilung von Methylestergruppen entlang der Homogalacturonaneinheit. A) blockweise Verteilung, welche über B) zu C) stärker alternierend wird. Daas et al. 2000b.	17
Abbildung 5: Mögliche Funktionalisierungen (Methylester- und Amidgruppe) an der α -D- Galacturonsäureeinheit, der am häufigsten vorkommenden Struktureinheit des Pektins. 18	
Abbildung 6: Bindung von Ferulasäure an L-Arabinose in der Arabinogalactan I-Struktur. 19	
Abbildung 7: Die Struktur des RG I-Rückgrates und repräsentativer Seitenketten. Die Struktur von RG I besteht aus α -(1,2)-L-Rhamnose und α -(1,4)-R-Galacturonsäure- Wiederholungseinheiten. Als Seitenketten sind α -(1,5)-L-Arabinose (Arabinogalactan), β - (1,4)-Galactose und Arabinogalactan I gezeigt. Arabinogalactan I besteht wiederum aus β -(1,4)-Galactoseketten mit α -(1,3)-L-Arabinose-Verzweigungen.	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Rhamnogalacturonan II-Struktur. Die entsprechenden Di- bzw. Oligosaccharid-Seitenketten sind farblich unterlegt. ^[45]	21
Abbildung 9: Zwei Apiosylreste durch einen Boratdiester verknüpft. Das Boratom ist chiral und es können zwei Diastereoisomere (Bis [3C- (hydroxymethyl) - β -L-threofuranosid] - (R) -2,3: 2', 3'-Borat) und (Bis [3-C- (hydroxymethyl) - β -L-threofuranosid] - (S) -2,3: 2', 3'-Borat auftreten. (O'Neill et al., 2004).	22
Abbildung 10: Lineares Modell von Pektin. Gezeigt sind die unverzweigten HG-Einheiten und die mit Neutralzuckern verzweigten RG I-Einheiten aus Zitruspektin (adaptiert v. Yapo, 2011). ^[11]	24
Abbildung 11: Schematische Darstellung des RG I-Modells, die das RG I-Rückgrat und die Positionierung von HG und XGA sowie Arabinanen I-Seitenketten zeigt (adaptiert v. Yapo, 2011). ^[11]	25

Abbildung 12	Schematische Darstellung des „living thing-like“ Modells mit zwei unverzweigten HG-Blöcken, welche einen RG I-Kern umfassen. Diese sind abwechselnd miteinander verbunden. Zwei RG II-Einheiten sind am reduzierenden Ende der beiden abgewinkelten HG-Blöcke angebunden (adaptiert v. Yapo, 2011). ^[11]	26
Abbildung 13:	Darstellung des „egg-box“-Modells (links) sowie die Koordination eines Calciumatoms (rechts), adaptiert aus dem Calcium-Guluronatmodell von Braccini und Pérez von 2001. Die dunklen Kreise repräsentieren die Sauerstoffatome, welche an der Koordination des Calcium-Ions beteiligt sind. ^[85]	29
Abbildung 14:	Schema der Bindungszonen eines Calcium-Pektinat-Gels nach dem „cable model“, adaptiert nach Goldberg et al. 1996. Dabei sind zwei Aggregationen dargestellt, zum einen die „egg-box“-Konformation, zum anderen die Ausbildung von 3_1 -helikalen Ketten-Konformationen. ^[90]	30
Abbildung 15:	Bindungsaffinität von Zitruspektin bzw. LM Pektin in Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen, nach Dronnet et al. 1996. ^[96]	31
Abbildung 16:	Schematische Darstellung des Kettenabbaus am Pektinrückgrat, im Säuren durch Hydrolyse (oben) und im Alkalischen durch Eliminierung (unten).	34
Abbildung 17:	Bildung der Tetrabutylammoniumsalzform von Pektin mit anschließender Alkylierung der Carboxylatgruppe durch Alkylhalogenide.	36
Abbildung 18:	Pyridin katalysierte Acetylierung von Pektin mit Essigsäureanhydrid in Formamid.	37
Abbildung 19:	Schematische Darstellung der Veresterung der Pektin-OH-Gruppen mit Palmitinsäure-, Ölsäure- oder Linolsäureanhydrid durch mechanisches Mahlen, katalysiert durch Kaliumcarbonat.	39
Abbildung 20:	Schematische Darstellung der Amidbildung von Pektin mit Ammoniak in Methanol.	40
Abbildung 21:	Schematische Darstellung der Amidbildung von Pektin mit N-Octadecylpektinamid in Methanol, heterogen.	41
Abbildung 22:	Umsetzung von Pektin mit 3-Chlor-2-hydroxypropyltrimethylammoniumchlorid (CHPTAC) in Wasser, basisch katalysiert. ^[174]	41
Abbildung 23:	Schematische Darstellung der Thiolierung von Pektin durch die Veresterung mit α -Mercaptoessigsäure, katalysiert durch Salzsäure.	43

Abbildung 24:	Schematische Darstellung der Thiolierung von Pektin in Wasser / Dioxan mit a) 4-Aminothiophenol und b) Cystein nach der Aktivierung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDAC)	43
Abbildung 25:	Schematische Darstellung der Sulfatierung von Pektin mit trisulfoniertem Natriumamin $[N(SO_3Na)_3]$	44
Abbildung 26:	Schematische Darstellung der Oxidation von Pektin mit Natriumperodat in einem Wasser / Ethanol-Gemisch.	45
Abbildung 27:	Schematische Darstellung der Reaktion zwischen Pektin und Glycidylmethacrylat in Wasser, sauer katalysiert.	46
Abbildung 28:	Schematische Darstellung der Reaktion zwischen Pektin und n-Butylglycidylether in Wasser, basisch katalysiert.	47
Abbildung 29:	Schematische Darstellung zweier vernetzter HG-Einheiten nach der Umsetzung mit Epichlorhydrin.	48
Abbildung 30:	Schematische Darstellung zweier vernetzter HG-Einheiten nach der Umsetzung mit Adipinsäure.	48
Abbildung 31:	Schematische Darstellung zweier vernetzter HG-Einheiten nach der Umsetzung mit Natriumtrimetaphosphat.	49
Abbildung 32:	1H -NMR-Spektrum von Ammoniumpolygalacturon (NH_4 -PGal), Ammoniumpektinat CP9 (DM von 0,1) und Ammoniumpektinat CP7 (DM von 0,3) gemessen in D_2O	54
Abbildung 33:	^{13}C -NMR-Spektrum von Ammoniumpolygalacturon (NH_4 -PGal), Ammoniumpektinat CP9 (DM von 0,1) und Ammoniumpektinat CP7 (DM von 0,3) gemessen in D_2O	55
Abbildung 34:	Größenausschlusschromatographie von Ammoniumpolygalacturonat (NH_4 -PGal), Pektin CP9 und Pektin CP7 in Wasser.	56
Abbildung 35:	<i>Schema der Acetylierung mit Übersicht der verschiedenen Acetylierungsreagenzien.</i>	57
Abbildung 36:	Schematische Darstellung der Acetylierung von Polygalacturonsäure mit Essigsäurevinylester in Formamid.	59
Abbildung 37:	Infrarotspektren a) Polygalacturonsäure, b) Natrium Polygalacturonat, c) acetylierte Polygalacturonsäure und d) Acetylpoylgalacturonsäure Natriumsalz.	62

Abbildung 38:	¹ H-NMR-Spektrum von acetylierter Polygalacturonsäure (Ac 16), erhalten durch die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid (Ac ₂ O), gemessen in #D ₂ O.....	63
Abbildung 39:	¹ H-NMR-Spektrum von acetylierter Polygalacturonsäure (Ac 22), erhalten durch die Umsetzung mit Acetylchlorid (AcCl), gemessen in #D ₂ O.....	64
Abbildung 40:	Elutionskurven von Natriumpolygalacturonat und Polygalacturonsäure, behandelt bei 50 °C für 5 h mit je 5,0 Äq. Acetylchlorid (AcCl) Ac 22 und Essigsäureanhydrid (Ac ₂ O) Ac 17, gemessen in Wasser.	65
Abbildung 41:	Syntheschema zur Anbindung von Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) an Polygalacturonsäure (PGaIS) bei RT und 80 °C in Formamid.	66
Abbildung 42:	Kalibriergerade von Fluoreszeinisothiocyanat ermittelt bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$ in Wasser bei pH 9,0.	67
Abbildung 43:	UV-Vis-Spektren von Fluoreszein in Wasser mit den zuvor ermittelten Standards I – V (von $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ bis $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) und den markierten Fluoresceinthiocarbamaten der Polygalacturonsäure mit unbekannter Konzentration.	68
Abbildung 44:	Schematische Darstellung der Polysaccharidfilmherstellung. Das Metall wird in die Polymerlösung getaucht (1.), anschließend ohne (2.a) und mit Spülvorgang (2.b) in flüssigem Stickstoff schockgefroren (3.) und gefriergetrocknet. Danach wurde der getrocknete Film abgelöst (4.) und untersucht.	68
Abbildung 45:	Modellvorstellung zur Ausbildung eines Pektingradienten beim Abscheiden auf einer Metalloberfläche.....	69
Abbildung 46:	Emissionswerte der konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen einer Polyurethan-Polygalacturonsäure Dispersion (PUD) abgeschieden auf Glas und Stahl-Substrat (CRS).	70
Abbildung 47:	Emissionswerte der konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen einer Epoxi-Phenol-Polygalacturonsäure Dispersion (EPD) abgeschieden auf Glas und Stahl-Substrat (CRS).	71
Abbildung 48:	Emissionswerte der konfokale Fluoreszenzmikroskopie einer Epoxi-Phenol-Dispersion (EPD) und PGaIS auf Stahl-Substrat (CRS) ohne anschließenden Spülvorgang.	72
Abbildung 49:	Herstellung von mit Berberinchlorid markierten Natrium-Polygalacturonat (Na-PGal).	72

5 Anhang

Abbildung 50:	Syntheschema zur Anbindung von Phenylisothiocyanat an PGaIS bei 80°C in Formamid.	74
Abbildung 51:	Silylierung von in Formamid gelöster Polygalacturonsäure (PGaIS) mit 1) Trimethylsilylchlorid/Imidazol und 2) 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan bei erhöhten Temperaturen.	75
Abbildung 52:	¹ H-NMR-Spektrum von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal), erhalten durch die Umsetzung mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS), gemessen in #D ₂ O.	78
Abbildung 53:	Teil eines HSQC-NMR-Spektrums von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal, Si 9), gemessen in #D ₂ O. Der Teil der Polysaccharid-Wiederholungseinheit ist gezeigt. Das Signal des an Kohlenstoff C5 befindlichen Protons wird mit dem Lösungsmittelsignal überlagert.	79
Abbildung 54:	Diffusions-NMR-Spektrum von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal, Si 10) in Deuteriumoxid. Die Hydrolyse im Lösungsmittel führt zur Bildung von Trimethylsilylalkohol, der eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit als die an das Polymergerüst gebundenen Trimethylsilylgruppen zeigt (gestrichelte Linie).	80
Abbildung 55:	¹ H-NMR-Spektrum von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal), erhalten mit Trimethylsilylchlorid (TMSCl) und Imidazol, gemessen in #D ₂ O.	81
Abbildung 56:	¹³ C-NMR-Spektrum von Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal), erhalten aus der Reaktion von Polygalacturonsäure (PGaIS) mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS), gemessen in #D ₂ O.	82
Abbildung 57:	FTIR-Spektren (KBr) von a) Polygalacturonsäure (PGaIS), b) Ammoniumpolygalacturonat, c) Trimethylsilylpolygalacturonat (TMS-PGal), erhalten mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan und d) TMS-PGal mit Trimethylsilylchlorid / Imidazol.	83
Abbildung 58:	Nebenreaktion bei der Silylierung von Polygalacturonsäure. a) Die Umsetzung mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan wandelt die aktivierte Carbonsäure in ein Amid um. b) Die Umsetzung mit Trimethylsilylchlorid und Imidazol kann durch Esterbildung zur Vernetzung führen. Eine Imidazolid-Spezies ist das wahrscheinlichste Zwischenprodukt für diese Nebenreaktion.	84
Abbildung 59:	Elutionskurven von Ammoniumpolygalacturonat und ein hydrolysiertes Trimethylsilylpolygalacturonat (Si 10) aus der Synthese mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan bei 70 °C synthetisiert wurde, gemessen in Wasser.	85

Abbildung 60:	Elutionskurven von Ammoniumpolygalacturonat und ein hydrolysiertes Trimethylsilylpolygalacturonat (Si 4), das mit Trimethylsilylchlorid bei 50 °C synthetisiert wurde, gemessen in Wasser.	85
Abbildung 61:	Schema zur Silylierung von Polygalacturonsäure (PGaIS) in Formamid mit tert-Hexyldimethylchlorsilan (TDSCI), tert-Butyldimethylchlorsilan (tBDMCI), Dimethylvinylchlorsilan (DMVinCI) und Dimethylphenylchlorsilan (DMPSCI) bei erhöhten Temperaturen (50 °C und 70 °C).	86
Abbildung 62:	¹ H-NMR-Spektrum von tert-Hexyldimethylsilylpolygalacturonat (TDS-PGal, Si-12), gemessen in ² D ₂ O.	90
Abbildung 63:	Diffusions-NMR-Spektrum von tert-Hexyldimethylsilylpolygalacturonat (TDS-PGal, Si 12) in Deuteriumoxid. Vergleichbare Diffusionskoeffizienten zeigen die Stabilität der Si-O Bindung zwischen PGaIS und dem Silan gekennzeichnet durch eine gestrichelte Linie.	92
Abbildung 64:	¹ H-NMR-Spektrum von tert-Hexyldimethylsilylpolygalacturonat (TDS-PGal, Si 16), erhalten durch die Umsetzung mit tert-Hexyldimethylchlorsilan (TDSCI), gemessen in ² DMSO-d ₆	93
Abbildung 65:	¹ H-NMR-Spektrum von tert-Butyldimethylsilylpolygalacturonat (tBDM-PGal, Si 19), gemessen in ² DMSO-d ₆	93
Abbildung 66:	¹ H-NMR-Spektrum von Dimethylphenylsilylpolygalacturonat (DMP-PGal, Si 28), in ² DMSO-d ₆	94
Abbildung 67:	¹ H-NMR-Spektrum von Dimethylvinylsilylpolygalacturonat (DMVin-PGal, Si 32), erhalten durch die Umsetzung mit Dimethylvinylchlorsilan (DMVinCI), gemessen in ² DMSO-d ₆	94
Abbildung 68:	Größenausschlusschromatogramm, welches das Elutionsvolumen gegen die Signalintensität für Tetrabutylammoniumpolygalacturonat (TBA-PGal, als Referenzmaterial) und von zwei tert-Hexyldimethylsilylpolygalacturonaten (TDS-PGal, Si 14 und Si 18) zeigt, gemessen in DMSO.	95
Abbildung 69:	Größenausschlusschromatogramm, welches das Elutionsvolumen gegen die Signalintensität für Tetrabutylammoniumpolygalacturonat (TBA-PGal, als Referenzmaterial) und von zwei tert-Butyldimethylsilylpolygalacturonaten (tBDM-PGal, Si 19 und Si 22) zeigt, gemessen in DMSO.	96

Abbildung 70:	Größenausschlusschromatogramm, welches das Elutionsvolumen gegen die Signalintensität für Tetrabutylammoniumpolygalacturonat (TBA-PGal, als Referenzmaterial) und zwei Dimethylphenylsilylpolygalacturonate (DMP-PGal, Si 23 und Si 28) zeigt, gemessen in DMSO.	96
Abbildung 71:	Größenausschlusschromatogramm, welches das Elutionsvolumen gegen die Signalintensität für Tetrabutylammoniumpolygalacturonat (TBA-PGal, als Referenzmaterial) und zwei Dimethylvinylsilylpolygalacturonate (DMVin-PGal, Si 29 und Si 32) zeigt, gemessen in DMSO.	97
Abbildung 72:	Schematische Darstellung der Auflösung von Polygalacturonsäure in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid bei 140 °C unter teilweiser Bildung des 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumsalzes.	99
Abbildung 73:	Links: Geschmolzenes 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid bei 70 °C, Mitte: Salzsäuredetektion durch pH-Indikator, rechts: abgekühlte Lösung (70 °C) von PGaIS in der IL (S6).....	99
Abbildung 74:	Temperaturabhängiger Viskositätsverlauf von 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (BMIMCl) und verschiedenen Konzentrationen der in BMIMCl gelösten Polygalacturonsäure.	101
Abbildung 75:	¹ H-NMR-Spektren von a) Natriumpolygalacturonat (erhalten durch Auflösung der Polygalacturonsäure in #D ₂ O / NaOD) und b) 1-n-Butyl-3-methylimidazolium-Polygalacturonat (regeneriert aus dem gelösten Zustand in #D ₂ O).	101
Abbildung 76:	FTIR-Spektren von a) Polygalacturonsäure (PGaIS), b) Natriumpolygalacturonat und von c) 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumpolygalacturonat (erhalten durch Lösen von PGaIS in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid und Regenerierung).	102
Abbildung 77:	Größenausschlusschromatographie in Wasser von Natriumpolygalacturonat (25 °C) und Polygalacturonsäure, behandelt bei 80 °C und gelöst bei 140 °C in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid, regeneriert und in das Natriumsalz umgewandelt.	104
Abbildung 78:	Röntgenbeugungsdiagramm von Polygalacturonsäure vor (1) und nach (2) dem Auflösen und Regenerieren. Das Muster der 1-n-Butyl-3-methylimidazolium	

(BMIM) -Salzform von PGaIS (3), die während des Auflöses gebildet wird, ist ebenfalls gezeigt. 105

Abbildung 79: Wechselwirkung von 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid mit Polygalacturonsäure (PGaIS). Die Wasserstoffbrückenbindung befindet sich innerhalb der PGaIS-Kette. 1. Chloridionen interagieren mit den vorhandenen Wasserstoffatomen der Hydroxylfunktionen. Dadurch werden intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen. 2. Bildung der Carboxylatform von PGaIS und Freisetzung von Chlorwasserstoff. 106

Abbildung 80: Syntheschema zur Anbindung von Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) an Polygalacturonsäure (PGaIS) bei 80 °C in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (BMIMCl). 107

Abbildung 81: Kalibriergerade für die Bestimmung des Berberingehaltes von Pektinproben. Absorption bei $\lambda_{\text{max}} = 357 \text{ nm}$ aufgetragen gegen die Konzentration von Berberinchlorid in Wasser. 118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Acetylierung von Pektin bzw. Pektinderivaten seit 1936.	38
Tabelle 2: Reaktionsparameter für die Acetylierung von CP7, CP9 und PGaIS mit Essigsäureanhydrid, Acetylchlorid und Essigsäurevinylester. Die hier gezeigten Produkte sind wasserlöslich.	58
Tabelle 3: Reaktionsparameter für die Acetylierung von PGaIS mit Acetylchlorid und Essigsäurevinylester. Die hier gezeigten Produkte sind wasserlöslich.	60
Tabelle 4: Zahlenmittel der Molmasse (M_n) und Polydispersität (\bar{D}) von Natriumpolygalacturonat und Polygalacturonsäure, behandelt im Vergleich a) bei 50 °C für 5 h mit je 5,0 Äq. Acetylchlorid (AcCl) und Essigsäureanhydrid (Ac ₂ O) und Vergleich b) bei 50 °C für 5 h mit je 10,0 Äq. Acetylchlorid (AcCl) und Essigsäureanhydrid (Ac ₂ O).64	64
Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für die Fluoreszenzmarkierung von Polygalacturonsäure in Formamid, bei 18 h Reaktionszeit.	67
Tabelle 6: Reaktionsübersicht und Ausbeuten der ionischen Anbindung von Berberinchlorid bei Raumtemperatur.	73
Tabelle 7: Reaktionsparameter und Produkte der Silylierung von Polygalacturonsäure (PGaIS) in Formamid unter Verwendung von Trimethylsilylchlorid (TMSCl) oder 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS).	77
Tabelle 8: Reaktionsparameter und Produkte aus der Umsetzung von Polygalacturonsäure (PGaIS) in Formamid mit tert-Hexyldimethylchlorsilan (TDSCl), tert- Butyldimethylchlorsilan (tBDMCl), Dimethylvinylchlorsilan (DMVinCl) und Dimethylphenylchlorsilan (DMPSCl) zusammen mit Imidazol als Base (je 1,5 Äquivalenten bezogen auf das Chlorsilan).	87
Tabelle 9: Spezifische Viskosität bei 50 °C und 70 °C von verschiedenen Polygalacturonsäure- Konzentrationen in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid.	100
Tabelle 10: Zahlenmittel der Molmasse (M_n) und Polymerisationsgrad (DP) von Natriumpolygalacturonat (25 °C) und Polygalacturonsäure, behandelt bei 80 °C und gelöst bei 140 °C in 1-n-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid.	103
Tabelle 11: Reaktionsbedingungen für die Fluoreszenzmarkierung von Polygalacturonsäure in 1-n-Butyl-3-methylimidazolium (BMIM), bei 18 h Reaktionszeit.	108

Publikationsliste

1. **Efficient and catalyst-free synthesis of cellulose acetoacetates**

Würfel, H., Kayser, M. and Heinze T. (2018) Cellulose, 25, 4919-4928.

2. **Trimethylsilylation of Polygalacturonic acid**

Würfel, H., Kayser, M. and Heinze T. (2019) Macromolecular Chemistry and Physics, 220(9), 1900002.

3. **Non-aqueous Solvent for Efficient Dissolution of Polygalacturonic Acid**

Würfel, H., Kayser, M. and Heinze T. (2019) Carbohydrate polymers, 207, 791-795.

Danksagung

Als erstes danke ich meinem Betreuer Prof. Dr. Thomas Heinze, der mir die Möglichkeit eröffnete meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Besonders hervorzuheben sind dabei die immer konstruktiven und hilfreichen Diskussionen, auch wenn auf Grund meiner beruflichen Tätigkeit die Frequenz der Treffen nicht immer ideal war, half mir jedes einzelne unserer Gespräche. An zweiter Stelle, aber auch nicht weniger möchte ich Dr. Hendryk Würfel danken, der mir als Kollege immer zur Seite stand und im Laufe der Arbeit zu einem guten Freund geworden ist.

Ein großer Dank gehört darüber hinaus meinem ehemaligen Chef Dr. Daniel Wasserfallen, der mir durch die Möglichkeit auf Selbstorganisation im beruflichen Umfeld einen zusätzlichen Rahmen zur Erstellung dieser Arbeit gab. Weiterhin gehört meine Wertschätzung Dr. Mubarik Chowdhry, der mir zu enormer beruflicher Förderung auch einen zeitlichen Freiraum ermöglichte. Zudem möchte ich allen meinen Kollegen aus dem beruflichen Umfeld danken, welche stets ein motivierendes Wort fanden und Ihre Unterstützung anboten, im Speziellen Stephanie Gerold, Dr. Andreas Treitl, Irene Schledowetz und Vivien Bachmann.

Auch meinen Kollegen des Kompetenzzentrums für Polysaccharid Forschung der Universität Jena danke ich für Ihr Engagement, ganz besonders Peggy Laudeley und Anett Pfeifer. Dem technischen Personal des Instituts für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für die durchgeführten Messungen und die Unterstützung bei deren Auswertung.

Weiterhin möchte ich meinen Dank an Dr. Manfred Wagner für seine fachliche Expertise und der Durchführung von nicht standardisierten NMR-Untersuchungen richten.

Eine ganz besondere Wertschätzung geht an John Purifoy Thompson, der mir immer wieder wegweisend zur Seite stand und meine persönliche Entwicklung in jeglicher Hinsicht förderte.

Schließlich danke ich meinen Freunden und Familie, ganz besonders ohne die Unterstützung meiner Eltern und Familie wäre dies in vieler Hinsicht nicht möglich gewesen, Ihr standet während der gesamten Zeit hinter mir. Und auch für das Verständnis meiner guten Freunde, Lukas Fyrnys, Sarah Van Esselen und Christian Zentgraf, für die sehr limitierte Zeit aber doch unzähligen schönen Momente.